

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Freien Universität Berlin — Klinikum Westend —
Direktor: Professor Dr. med. E.S. Bücherl

**THROMBOZYTENADHÄSION
AN KUNSTSTOFFOBERFLÄCHEN VOR UND NACH
PROTEINISIERUNG, IN VITRO UND IN VIVO**

Inaugural - Dissertation
zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Richard Thiele
aus Pare

1903



Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Freien Universität Berlin - Klinikum Westend -

Direktor: Professor Dr.med. E.S. Bücherl

THROMBOZYTENADHÄSION AN KUNSTSTOFFOBERFLÄCHEN VOR UND NACH
PROTEINISIERUNG, IN VITRO UND IN VIVO

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Richard Thiele
aus Pare

Referent: Prof. Dr. med. E.S. Bücherl

Koreferent: Prof. Dr. med. R. Thom

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 1.6.1983

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung
 - 1.1. Anforderungen an Kunststoffe für Implantate im Blutkontakt
 - 1.2. Literaturübersicht
 - 1.3. Andere Testverfahren
 - 1.3.1. in-vitro-Testverfahren
 - 1.3.2. in-vivo-Testverfahren
 - 1.3.3. ex-vivo-Testverfahren
2. Methode
 - 2.1. Standardisierung der Methode
 - 2.2. Untersuchungsgut
 - 2.3. Berechnungsmethode
 - 2.3.1. Berechnungsbeispiel
 - 2.4. in-vitro-Versuche mit Kälberblut
 - 2.4.1. Herstellung von plättchenreichem Plasma (PRP)
 - 2.4.2. Markierung der Thrombozyten mit ^{51}Cr
 - 2.4.3. Prüfung der Thrombozytenfunktion
 - 2.4.4. Testverlauf
 - 2.5. in-vitro-Versuche mit Hundeblut
 - 2.5.1. Herstellung von plättchenreichem Plasma (PRP)
 - 2.5.2. Markierung der Thrombozyten mit ^{51}Cr
 - 2.5.3. Prüfung der Thrombozytenfunktion
 - 2.5.4. Testverlauf
 - 2.6. ex-vivo-Versuche Kalb
 - 2.6.1. Markierung der Thrombozyten mit ^{51}Cr
 - 2.6.2. Prüfung der Thrombozytenfunktion
 - 2.6.3. Prüfung der Thrombozytenüberlebenszeit
 - 2.6.4. Flußmessung und konstante Flußeinstellung im Shunt
 - 2.6.5. Testverlauf
3. Ergebnisse
 - 3.1. in-vitro-Versuche mit Kälberblut
 - 3.1.1. Prüfung der Thrombozytenfunktion
 - 3.1.2. Thrombozytenadhäsion

- 3.2. in-vitro-Versuche mit Hundeblut
 - 3.2.1. Prüfung der Thrombozytenfunktion
 - 3.2.2. Thrombozytenadhäsion
- 3.3. ex-vivo-Versuche Kalb
 - 3.3.1. Prüfung der Thrombozytenfunktion
 - 3.3.2. Prüfung der Thrombozytenüberlebenszeit
 - 3.3.3. Thrombozytenadhäsion
- 4. Diskussion
- 5. Zusammenfassung
- 6. Literaturverzeichnis

1. Einleitung

Schon seit Jahrzehnten werden Kunststoffe in der Chirurgie verwendet.

Bei der Entwicklung von Biomaterialien mit antithrombotischen oder thromboresistenten Eigenschaften wurden jedoch vor 1960 nur geringe Erfolge erzielt.

Anfang dieses Jahrhunderts erfolgten die ersten Untersuchungen mit Paraffinbeschichtung von Glasröhrchen. Dabei stellte sich heraus, daß das Blut in unbeschichteten Glasröhrchen doppelt so schnell gerann wie Blut in beschichteten. Nach der Entdeckung von Siliconverbindungen konnte nachgewiesen werden, daß dieses Material ebenfalls die Gerinnungszeit entscheidend verlängern konnte (26, 65). Mit den bedeutenden Fortschritten in der Herzchirurgie wurde weltweit das Interesse wach, neue bioverträgliche Kunststoffe zu entwickeln, um sie als Materialien für den Blutkontakt zu verwenden. Hervorzuheben sind hierbei die künstlichen Herzklappen, die trotz intensiver Forschung zum größten Teil nicht klinisch eingesetzt wurden, da das Problem der Thrombenentstehung an den Oberflächen nicht vollständig gelöst werden konnte. Neben Materialien wie Silicongummi verzögerten im Vergleich zu Glas auch Methylmethacrylate, Teflon und Dacron die Thrombenentstehung, wobei die beiden letztgenannten Polymerfabrikate Ende der 50er Jahre intensiven klinischen Prüfungen unterzogen wurden und sich als relativ gut erwiesen, zumindest für den großkalibrigen Gefäßersatz. Diese Polymere waren jedoch keine wirklich thromboresistenten Materialien, da ihre Blutverträglichkeit durch Entstehung von körpereigenen intimaähnlichen Überzügen begründet ist. Diese Möglichkeit der Durchwachsbarkeit des Kunststoffes ergibt sich bei Gefäßprothesen, da eine präoperative Abdichtung durch "Praeclotting" besteht. Bei anderen Anwendungsarten, wie Herzklappen und pneumatisch betriebenen Blutpumpen, ist diese Möglichkeit nicht



gegeben, da flüssigkeits- und teilweise gasdichte, glatte Oberflächen und Membranen benötigt werden.

1.1. Anforderungen an Kunststoffe für Implantate im Blutkontakt

Mit der weiteren Entwicklung von komplizierteren und anspruchsvolleren Anwendungsformen für Kunststoffe, wie zum Beispiel dem künstlichen Herzen, wurde es dringend notwendig, Materialien herzustellen, die den besonderen Anforderungen gerecht wurden.

Jedes Material, welches in Blutkontakt kommt, als Katheter, Gefäßplastik, künstliche Niere oder künstliches Herz, muß folgende Mindestforderungen erfüllen:

- keine Beschädigung von Blutbestandteilen
- keine oberflächeninduzierte Blutgerinnung
- kein Gehalt an toxischen Substanzen
- Widerstand gegen Biodegradation (biologische Resistenz)
- hohe und dauerhafte mechanische Belastbarkeit
- Sterilisierbarkeit.

Neben diesen Grundvoraussetzungen sind für spezielle Anwendungsgebiete noch besondere Eigenschaften notwendig, so zum Beispiel die absolute Undurchlässigkeit für Gase beim pneumatischen Antrieb von Kunsterzen oder eine große Oberflächenglätte von Biomaterialien, die lange Zeit im Körper verweilen sollen. Infolgedessen wurden zunehmend sogenannte "maßgeschneiderte Polymere" hergestellt. Eine große Zahl von neusynthetisierten Kunststoffen war die Folge, deren Eignung erst im klinischen Versuch nachgewiesen werden muß (s. Abb. 1).

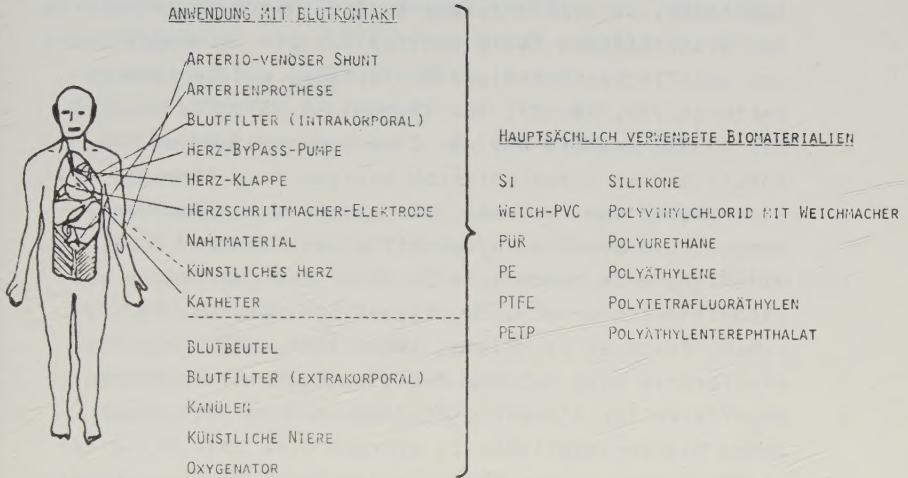


Abb. 1: Anwendungsbeispiele von Kunststoffen im Kontakt mit Blut und Reihe der hauptsächlich hierfür verwendeten Kunststoffe (nach Fischer J.B. et al., 21)

Trotz vieler Teilerfolge im Bereich der Blutkontaktforschung kann bisher von einem voll befriedigenden Ergebnis nicht gesprochen werden, was auch in dem Thema der Arbeit von J.D. Andrade "Blood-Material-Interactions, 20 years frustration" (ASAIO 1981) zum Ausdruck kommt.

1.2. Literaturübersicht

Als zentrales Problem des Blut-Kunststoff-Kontaktes stellt sich neben der Dauerfestigkeit des Materials die Induktion der Koagulationsmechanismen und damit die Bildung thrombotischen Auflagerungen. Zu Beginn steht die

Adsorption von Proteinen (4, 23, 47, 49, 50, 53, 63, 70, 78), da Thrombozyten gewissermaßen Proteine als Cofaktor benötigen, um sich anzulagern. Eine Aggregation adhären-ter Blutplättchen führt schließlich zur Thrombenbildung und oberflächenabhängiger Freisetzung von Gerinnungs-faktoren (11, 12, 17, 32, 47, 48, 50, 51, 53, 68, 71). Das Ausmaß und die Art der Eiweißadsorption und der Induktion der Koagulationsmechanismen ist abhängig von einer Reihe von Faktoren, wie elektrische Oberflächen-ladung, Hydrophobie, Hydrophilie der Kontaktfläche, Materialglätte, chemische Struktur der Oberfläche und Expositionsdauer (23, 30, 43, 47, 49, 50, 53, 63, 70). Lyman, Brash et al. (1965, 1968, 1974, 1975) stellten die Theorie auf, daß die Prädisposition einer Kunststoff-oberfläche für Albumin gleichzusetzen sei mit einer guten Blutverträglichkeit, während eine hohe Affinität zu Fibrinogen oder γ -Globulin beweisend für den thrombo- genen Charakter eines Materials sein soll (36, 47, 48, 49, 53, 63, 64, 70). Mason, Packham, Kim, Evans, Mustard und Lee führten, auf dieser Theorie basierend, Testver-fahren durch, um die Affinität von Biomaterialien zu Thrombozyten unter verschiedenen experimentellen Bedin- gungen zu erforschen und damit ihre Blutverträglichkeit zu bestimmen (16, 17, 36, 53, 63, 68, 70). Es gibt eine große Anzahl von Versuchsmethoden, um die Blutkompati-bilität von Kunststoffen zu prüfen. Die in-vitro-Testun- gen können nur bedingt eine Aussage über die Blutkompati-bilität eines Polymers machen, da immer nur einzelne Bedingungen der Realität eines komplizierten, lebenden Systems in-vitro nachvollzogen werden können und hämody- namische, enzymatische, hämatologische und reticuloendo- theliale Reaktionen nicht oder nur unvollständig berück- sichtigt werden. Dennoch haben sich einige in-vitro- Testungen in der Praxis als screening-Untersuchungen für die Vorauswahl von Materialien bewährt:

1.3. Andere Testverfahren

- in vitro
- material-thrombelastography (MTEG)
(Affeld et al., 1974, Carr et al., 1974,
Lemm et al., 1979) (3, 65)
- modifizierter Blutkompatibilitätstest von
Nosé (Nosé et al., 1973, Kaiser et al., 1979)
(35, 58)
- mikroskopische Auswertung von Testoberflächen
nach Kontakt mit Blut mittels Zählkammer
(Coleman et al., 1976) (12), (Wucherpennig, 1976) (78)
- Schlauchringversuch von Fischer et al., 1979 (21)
- Thrombozytenadhäsionsmessung im
künstlichen Blutkreislauf nach
Grabowski et al., 1977 (26).

Für die endgültige Beurteilung eines Biomaterials
werden in der Regel in-vivo-Tests und ex-vivo-Tests
durchgeführt:

- | | |
|--|---|
| - Vena cava Ring-Test | (Gott V.I., 1971)
(21, 25, 75) |
| - Atrial Sword | (Gott V.I., 1967) (24) |
| - Atrial Patch | (Kolff et al.) (24) |
| - Recirculation tubes | (Lyman P.J., 1974) (49) |
| - Renal embolus Test | (Kusserow B.K., 1970) (37) |
| - Beinvenentest | (Schaldach et al.) (67) |
| - Atrial ring implants on
mitral valve anulus | (Levowitz et al., 1962) (24) |
| - Arterio-venous shunt | (Lagergreen et al., 1970,
Große-Siestrup et al., 1978)
(29, 31) |

1.3.1. in-vitro-Testverfahren

MTEG (3):

Das MTEG ist eine Abwandlung der Thrombelastographie, einer Methode, die in Kliniken häufig benutzt wird, um pathologische Veränderungen der Blutgerinnung bei Patienten festzustellen.

Mit diesem sogenannten Thrombelastographen wird auf photokymographischem Wege die Gerinnungsbildung kontinuierlich verfolgt und aufgezeichnet. Die dabei entstehende Kurve wird Thrombelastogramm (TEG) genannt (s. Abb. 2). Der Thrombelastograph besteht aus einer zylindrischen Küvette aus V₂A-Stahl. Diese Küvette wird periodisch um ihre senkrechte Achse hin- und herbewegt. In der Küvette befindet sich ein zylindrischer Stift aus Stahl, der vom Boden und den Wänden der Küvette je 1 mm Abstand hat. Der Stift hängt an einem Torsionsdraht und trägt einen Hohlspiegel, der das Licht einer Glühlampe auf einen Film überträgt. Zur Messung kann Blut in den Zwischenraum zwischen Küvette und Stift gefüllt werden, und sobald die Gerinnung einsetzt, werden die Bewegungen der Küvette über den Stift und den Spiegel auf dem Film sichtbar gemacht. Um den Einfluß verschiedener Materialien auf die Blutgerinnung festzustellen, werden beim MTEG Küvette und Stift jeweils aus dem zu testenden Material hergestellt.

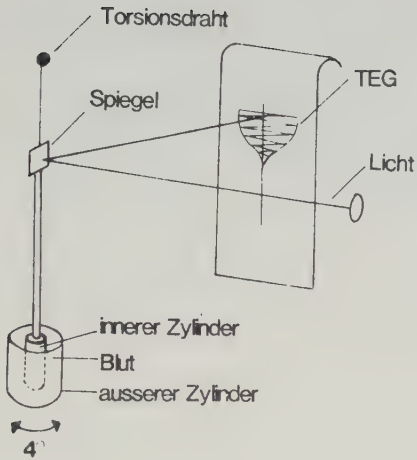


Abb. 2:
Das Prinzip der
Thrombelastographie
(MTEG)

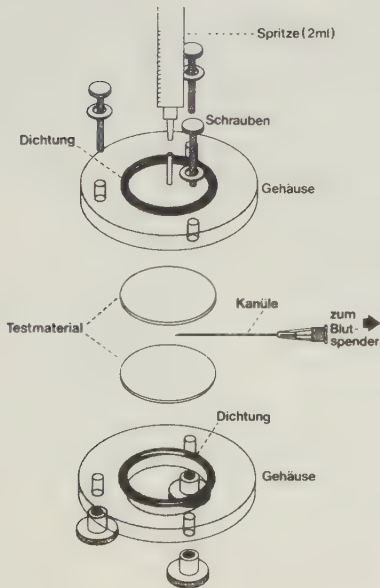


Abb. 3:
Testkammer zur Messung
der Blutverträglichkeit
in-vitro nach Nosé

Nosé-Testkammer (35):

(s. Abb. 3)

Die Testkammer besteht aus zwei äußeren, harten Schalen und zwei Testmembranen mit einer Nadel, die in das Lumen ragt (Größe 1) dazwischen. Nach unterschiedlichen Expositionszeiten von Blut und Testmaterial kann das getrocknete Thrombusgewicht, die Albumin- und Fibrinogenadsorption (mit radioaktiv markierten Proteinen), die Hämoglobinkonzentration im Restblut und der Hämopexin-Haptoglobin-Komplex des Plasmas gemessen werden.

Zählkammer (78)

Die Zählkammer setzt sich aus einer Grundplatte und einem Deckel zusammen. In den Deckel ist ein Zylinder eingefräst. In diesen Zylinder führt von außen zur Mittelachse eine Metallhülse, durch die das Testblut eingefüllt werden kann. Zur Abdichtung dient jeweils ein O-Ring an der Innenseite. Die beiden O-Ringe begrenzen den eigentlichen inneren Testraum, in den die Testfolien eingeklemmt werden können. Zur Auswertung der Testfolien werden sie in 5%iger Glutaraldehydlösung zur Fixierung gelegt, um sie mikroskopisch untersuchbar zu machen.

Schlauchring nach Fischer (21):

Die Messungen werden durchgeführt, indem der Testmaterialschlauch mit Blut gefüllt wird, anschließend zu einem Ring zusammengefügt (Umfang 75 cm) und dieser Ring dann so gedreht wird, daß eine Blutströmung entsteht. Die Beurteilung der Oberflächen erfolgt makro-, mikroskopisch oder nach radioaktiver Markierung der Blutbestandteile mit Hilfe eines Gamma-counters. Thrombozyten wurden nicht untersucht.

Thrombozytenadhäsionsmessung im künstlichen Blutkreislaufsystem nach Grabowski et al., 1977 (26)

Frisch abgenommenes heparinisiertes Blut wird in einem zirkulären Schlauchsystem mit einer Rollpumpe bei konstanter Flußgeschwindigkeit an verschiedenen Kunststoffoberflächen vorbeigeleitet, und die Materialien werden danach elektronenmikroskopisch begutachtet (26).

1.3.2. in-vivo-Testverfahren

- Vena cava Ring-Test: Ein Ring aus dem zu testenden Material wird in die Vena cava inferior eingesetzt und anfangs für 2 Stunden und in einer zweiten Serie für 2 Wochen dort belassen. Nachdem man sie wieder herausgenommen hat, wird die Thrombusentwicklung an den Enden, welche zum Herzen hin zeigen, verglichen und beurteilt (Gott et al., 1969, 1971) (25).

Eine Variationsmöglichkeit besteht in dem Einsatz des Ringes in die Vena jugularis, welche von R.L. Whalen et al., 1973 (77) versucht wurde. Man kann dabei zum Beispiel bei Wiederkäuern Proben mit größerem Durchmesser testen (24).

- Atrial sword (Gott et al., 1967) (24): Materialien, die auf ihre Antithrombogenität geprüft werden sollen, können in den rechten Vorhof implantiert und dort ein bis 30 Tage belassen werden. Ein "sword" (Schwert, s. Abb. 2) ist ein Plättchen, welches seitliche Ausbuchtungen besitzt, die den genauen Sitz und Lokalisation im Vorhof gewährleisten, da man es zwischen den Ausbuchtungen gut mit einer Ligatur oder Naht befestigen kann. Das "sword" kann nach Herausnahme auf Thromben untersucht werden und gibt bei Vergleich Auskunft über die verschiedenen Kunststoffe.

- Atrial patch (Kolff et al.) (24): Ein "Flickeneinsatz" aus dem zu testenden Material kann zum Beispiel bei Hunden in den rechten Vorhof oder in die Pulmonalarterie eingesetzt werden. Im allgemeinen wird ein Defekt mit 1 cm Durchmesser hergestellt, auf den der "Flicken" mit fortlaufender Naht eingesetzt wird. Nach 3 bis 4 Monaten können makro- bzw. mikroskopische Veränderungen beobachtet werden.

- Atrial ring implants on mitral valve anulus (Levowitz et al., 1962) (24): Um Thrombenentstehungen zu untersuchen, werden Kunststoffringe auf dem Anulus der Mitralklappe aufgesetzt. Der Ring wird in gleicher Art und Weise eingesetzt wie die künstliche Herzklappe, jedoch bleibt die natürliche Klappe erhalten. Wenn sich massive Thromben entwickeln, stirbt das Tier. Ansonsten wird das Tier nach mehreren Wochen geopfert und die Implantationsstelle begutachtet. Kontrolliert wird die Überlebenszeit bzw. die Thrombusgröße.

- Recirculation tubes (Lyman et al., 1974) (49): Die Testschläuche werden End zu Seite mit der freipräparierten Aorta descendens anastomosiert und der Blutstrom durch den Schlauch geleitet. Nach 1 bis 60 Minuten werden die Innenoberflächen beurteilt und mikroskopisch untersucht.

- Renal embolus (Kusserow et al., 1970) (37): Das Testsystem benutzt das Nierenstrombecken und -parenchym als biologischen Indikator für die Embolisierung. Eine subtotale Aortenabschnürung distal des Abgangs der Nierengefäße wird ergänzt durch die Implantation von einem Kunststoffring in die Aorta direkt oberhalb der Gefäße. So können nach genügend langer Expositionszeit von dem Ring ausgehend Embolie- und Infarktgebiete in der Niere festgestellt werden, um ver-

gleichend die Qualität eines Materials zu beurteilen.

- Der Beinvenentest nach Schaldach et al. (67) beruht auf der kurzzeitigen Implantation (3 - 10 h) von Kunststoffröhrchen in die Vena femoralis, um nach Abbruch des Versuches die Durchgängigkeit und Beschaffenheit des Testmaterials zu prüfen.

1.3.3. Ex-vivo-Testverfahren

- Arterio-venous shunt (Lagergreen et al., 1970, Große-Siestrup et al., 1978) (29, 31): Der AV-Shunt besteht aus einer extracorporalen Schlauchverbindung zwischen V. jugularis und A. carotis. Im Langzeit-A-V-shunt können verschiedene Arten von Testkammern dem Blutstrom auch für längere Zeitintervalle bei definierter Strömungsgeschwindigkeit ausgesetzt werden. Die exponierten Oberflächen werden auf Proteinadsorption, Thrombocytenadhäsion und Thromben untersucht.



VENA CAVA RING



ATRIAL FLAG



SWOLLEN



MITRAL VALVE RING



PATCH GRAFT

Abb. 4: Verschiedene Testkörper, die für in-vivo-Versuche benutzt werden.

Bei der Bewertung von Kunststoffen sind Tierexperimente notwendig, obwohl solche in-vivo-Versuche nicht unproblematisch sind. Verglichen mit den in-vitro-Testen haben dabei viele zusätzliche Einflüsse Folgen auf die Ergebnisse. Der Auswirkungsgrad des chirurgischen Eingriffes auf das biologische System ist schwierig zu beurteilen, die Gefahr von Infektionen ist zu beachten, und Antibiotika, Antikoagulantien und andere Therapeutika können die Ergebnisse beeinflussen. Deshalb erschien es sinnvoll, eine große Anzahl von in-vitro-Tests an den Anfang zu stellen, um die neusynthetisierten Biomaterialien zu selektieren und ihre Eigenschaften zu differenzieren.

Wenn jedoch die vielen Umstände berücksichtigt werden sollen, die verantwortlich sind für die Blutkompatibilität von elastomeren Kunststoffen bei Mensch und Tier, so reichen dazu in-vitro-Versuche nicht aus; in-vivo-Testmethoden auf der anderen Seite sind immer noch sehr kompliziert und teuer: jedes Versuchsmaterial, jede Exposition benötigt meist ein neues Tier.

Aus diesen Gründen wurde in der Experimentellen Chirurgie am Klinikum Westend, Berlin, von Große-Siestrup et al. (27, 29, 30, 31) ein ex-vivo-System entwickelt, das aus einem neuartigen arterio-venösen Shunt besteht. Dieser Shunt, der für die ex-vivo-Versuche benutzt wurde, hat eine extracorporale, hochglatte Silicon-Schlauch-Verbindung (ID: 5mm, OD: 7 mm) zwischen Arteria carotis und Vena jugularis bei einem Kalb. Er unterscheidet sich durch folgende Merkmale von herkömmlichen Shuntmodellen:

- zirkuläre, luftkammergepufferte Silastic-Dacronvelour-Dauerhautdurchleitungen
- hochglatter, semirigider vessel tip an der A. carotis
- hochflexible, weiche Siliconspitze als Verbindung zur V. jugularis an der entgegengesetzten Seite des Halses.

Das benützte Shuntkalb lebt seit mehr als 200 Tagen mit diesem Einsatz, und es zeigen sich noch keine Veränderungen, insbesondere keine Verminderung des Blutflusses, der 0,6 - 0,8 ml/min betrug.

Die Anwendung eines solchen AV-Shunts für die Bio-materialtestung besitzt folgende Vorteile:

- die schlauchförmigen Probekörper sind entweder kommerziell erhältlich, oder aber sie lassen sich leicht mit Testmaterial beschichten und modifizieren (72)
- die gleichen Testkörper können für ex-vivo- und in-vitro-Versuche genutzt werden
- es kann für mehrere Versuchsreihen mit dem selben Tier gearbeitet werden
- die Hämodynamik ist gleichmäßig und leicht zu kontrollieren.

ID: Innendurchmesser (inner diameter)

OD: Außendurchmesser (outer diameter)

2. Methode

2.1. Standardisierung der Methode

Die Aussagekraft eines Tests hängt weitgehend davon ab, inwieweit die äußeren Bedingungen definiert und Fehlerquellen eliminiert sind.

Es muß:

- a) die Blutmenge, die in Kontakt mit dem Testmaterial kommt, konstant sein;
- b) die Größe der Kunststoffoberfläche, die in Kontakt mit dem Blut kommt, genormt sein;
- c) der Kontakt des Blutes mit einem anderen Material als dem Testmaterial auf ein Minimum reduziert werden;
- d) die Temperatur konstant sein;
- e) die Blutwerte müssen konstant bleiben.

Diese Anforderungen wurden in den Versuchen weitgehend eingehalten.

- Das Testblut stammte bei den einzelnen Versuchen von jeweils demselben Kalb, einem Jersey-Kalb (3 - 4 Monate/ 60 - 70 kg) bzw. von demselben Hund, einem Collie (2 Jahre/ 12 kg).
- Für die ex-vivo-Versuche wurde nur ein Kalb verwendet.
- Laborchemische O-Wert-Bestimmungen der relevanten Blutwerte, -Hb, Erythrozytenzahl und Thrombozytenzahl, die im wesentlichen konstant waren, garantieren gleiche Ausgangswerte.
- Durch Vereinheitlichung der Markierungsart, der Markierungsdauer, der zu markierenden Thrombozytenzahlen und der Wirkdosis sollte die Markierungsrate für alle Versuche in der gleichen Größenordnung gehalten werden.

- Zu jedem Versuch wurden Eiweißbestimmungen im Plasma durchgeführt.
- Eine konsequente Fehlerrechnung soll die Vergleichbarkeit der Untersuchungen gewährleisten (Standardabweichung s_x , mittlerer Fehler des Mittelwertes $s_{\bar{x}}$).
- Für die Beurteilung der Proteinadsorption an Kunststoffen wurden die Versuche und Ergebnisse von W. Lemm et al. (39, 40) als Vorversuche herangezogen, da dabei die gleichen Materialien verwendet wurden.
- Alle für diese Versuche beanspruchten Tiere, Apparaturen und Materialien unterlagen tiermedizinischen, physikalischen und chemischen Kontrollen.
- Die einzelnen Versuchsreihen wurden mit AD1, AD2, AD3, AD4, AD5, AD6, AD7, AD8 bezeichnet.

2.2. Untersuchungsgut

Das Untersuchungsgut umfaßt 6 verschiedene Kunststoffschläuche. Silastic und Silastic 3140, zwei Silikon-gummi (Polydimethylsiloxan) wurden gewählt als in der Medizin vielfach verwendete Kunststoffe. Für die Gestaltung des künstlichen Herzens fanden sie vor Jahren Verwendung.

Weiterhin dienten als Testmaterialien Schläuche aus Polyvinylchlorid, ein Polyurethan, nämlich das Pellethane 2363-80A, das nach zwei unterschiedlichen Methoden verarbeitet wurde, und ein Pellethane-Silikon-Gemisch. Es wurden industriell gefertigte Schläuche verwendet, wobei einige zusätzlich im Polymerlabor der Experimentellen Chirurgie am Klinikum Westend, Berlin, beschichtet wurden (durch * gekennzeichnet).

Die getesteten Schläuche im einzelnen:

- Silastic (Si) ID: 6,4 mm, Fa. Dow Corning
- *- Silicon Polydimethylsiloxan Dow Corning
3140 RTV-Beschichtung (Si) ID: 8 mm
- Pellethane 2363-80AE
extrudiert (PUE) ID: 8 mm, Fa. Rehau
- *- Pellethane 2363-80A
(luftgetrocknet) (Pelle) ID: 8 mm
- Polyvinylchlorid mit
25 % Dioctylphthalat
extrudiert (PVC) ID: 8 mm, Fa. Rehau
- *- Pellethane-Silikon-
Gemisch mit 5 % PDMS (PuSi 5) ID: 8 mm

ID = Innendurchmesser

Si 3140, Pelle, PUE und PuSi wurden in den Versuchen AD-6 bis AD-8 nochmals mit verschiedenen Plasmaproteinen beschichtet (Albumin, γ -Globulin, Fibrinogen und

Vollplasma). Die Schläuche wurden nach Dampfsterilisation (30 min, 120°C) für 24 Stunden in die entsprechende Eiweißlösung gelegt. Aus früheren Bestimmungen von Lemm et al. (39) war bekannt, daß die Sättigungskinetik nach 24 Stunden Inkubation ihren Maximalwert erreicht hat. Für die einzelnen Versuche wurden Schläuche mit einer Länge von 30 cm (in vitro) und 60 cm (ex vivo) und einem Innendurchmesser von 8 bzw. 6,4 mm verwendet (Tab. 1).

Testmaterial 94 Schläuche a 12 Proben 1128 Proben 564 PRP

5 Versuche AD-4 - AD-8

564 PRP - Blut

* Schläuche

		AD-4	AD-5	AD-6	AD-7	AD-8	Summe
PVC	unbesch.	2 *	2	2	/	/	6
	unbeschichtet	2	2	2	/	2	8
PU	Albumin	/	/	2	2	2	6
	Globulin	/	/	/	2	/	2
	Fibrinog.	/	/	/	2	/	2
	Plasma	/	/	/	2	2	4
	unbesch.	/	2	2	/	2	6
PELLE	Albumin	/	/	2	2	2	6
	Globulin	/	/	/	2	/	2
	Fibrinog.	/	/	/	2	/	2
	Plasma	/	/	/	2	2	4
	unbesch.	/	2	2	/	2	6
SI	unbesch.	2	2	2	/	/	6
SI 3140	unbesch.	/	2	2	/	2	6
	Albumin	/	/	2	2	2	6
	Globulin	/	/	/	2	/	2
	Fibrinog.	/	/	/	2	/	2
	Plasma	/	/	/	2	/	2
PUSI	unbesch.	/	2	2	/	2	6
	Albumin	/	/	2	2	2	6
	Globulin	/	/	/	2	/	2
	Fibrinog.	/	/	/	2	/	2
	Plasma	/	/	/	2	2	4
		6	12	20	32	24	94

Tab. 1: Zusammenstellung der verwendeten Testmaterialien bei den in-vitro-Versuchen mit Kälberblut, insgesamt 94 Schläuche, 1128 Proben.

2.3. Berechnungsmethode

- A 1. Markierungsausbeute (%)
2. Thrombozytenanzahl (Konzentration $10^6/\text{mm}^3$)
3. Gesamtaktivität ($10^3 \text{ cpm}/\text{mm}^3$)
4. Spezifische Aktivität ($10^3 \text{ cpm}/10^6$ Thrombozyten)
- B 1. Aktivität pro Stück und pro Minute (cpm)
2. Aktivität pro mm^2 (cpm/mm^2)
- mittlere Innenoberfläche $O_i = 2\pi r_{\text{innen}}$
3. Thrombozyten pro mm^2 (Thromb./ mm^2)

$$B_3 = \frac{B_2}{A_4}$$

2.3.1. Berechnungsbeispiel

AD 5; Silastic und PRP + Blut beim Kalb

A 1. = 8 %

A 2. = 310 000 Thromb./ mm^3

A 3. = 49 080 cpm/ mm^3

A 4. = 158 000 cpm/ 10^6 Thrombozyten

B 1. = 89 cpm $s_x = \pm 27 \%$

$$s_{\bar{x}} = \pm 9 \%$$

B 2. = 0,16 cpm/ mm^2

B 3. = $\frac{B_2}{A_4} = \frac{0,16 \text{ cpm}/\text{mm}^2}{158 000 \text{ cpm}/10^6 \text{ Thromb.}} = 1,02 \text{ Thromb./mm}^2$
 $= 102 \text{ Thromb./cm}^2$

2.4. In-vitro-Versuche mit Kälberblut

2.4.1. Herstellung von plättchenreichem Plasma (PRP)

(nach der Methode von J.F. Mustard) (71)

2.4.1.1. Blutabnahme am Kalb: 500 ml in ein mit 75 ml ACD-Stabilisator der Formel A gefülltes Dreifach-Beutel-System der Firma Biotest Ffm.

pH = 7,0

2.4.1.2. 15 Min. bei 1000 U/min. in Beutel 1 zentrifugiert

2.4.1.5. Überstand (plättchenfreies Plasma = PFP) abgehoben.

2.4.1.6. In Beutel 2 verbleibt das stark plättchenreiche Plasma (PRP) mit Thrombozytenzahlen von 3,5 bis $4,0 \times 10^6$ pl/ μ l.

(Für die radioaktive Markierung ist eine hohe Blut-Plättchenzahl erforderlich, da die Markierungsausbeute stark von der Thrombozytendichte abhängig ist (15). Optimale Markierungsbedingungen in Hinsicht auf eine maximale Inkorporation von ^{51}Cr ist eine Markierung der Plättchen in einer Konzentration von $3 - 5 \times 10^6/\mu\text{l}$ in ACD-Ringer- Lsg.

(nach Adam et al.) (2).

Außerdem müssen Erythrozyten und Thrombozyten getrennt werden, da sie bei der Markierung um das ^{51}Cr konkurrieren (15).

2.4.2. Markierung der Thrombozyten nach der modifizierten Methode von Abrahamson mit ^{51}Cr (1).

2.4.2.1. Inkubation des PRP mit 1000 μCi ^{51}Cr für 30 min. Die Sättigungskurve zeigt bei 37°C und ACD-Plasma (pH = 7,3) nach einer halben Stunde einen ersten Höhepunkt, was ungefähr einer Markierungsausbeute von 13% entspricht (s. Abb. 5).

Cr 51 Aufnahme der Thrombozyten bei ACD-Plasma

in Abhängigkeit von der Zeit (nach Abrahamson)

Temp. 37°C

pH: 7,3

Aufnahme Cr 51

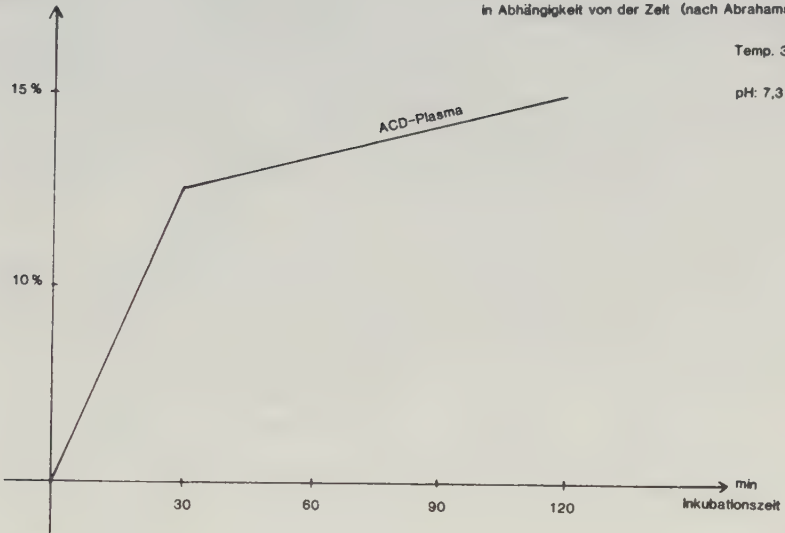


Abb. 5

2.4.2.2. Zugabe von 100 mg Ascorbinsäure (Reduktionsmittel).

Das ^{51}Cr der Oxydationsstufe VI wird in ^{51}Cr (III) überführt und ist als solches nicht mehr bindungsfähig.

2.4.2.3. 2 x mit PFP auswaschen zur Elimination des freien ^{51}Cr .

2.4.3. Prüfung der Thrombozytenfunktionsfähigkeit

2.4.3.1. Induzierte Aggregation im Braun Universal Aggregometer durch Thrombin. Meßgeräte: Universalaggregometer der Firma Braun Melsungen mit einem Photometer Eppendorf 1101 M Filter 546 nm, Kompensationsschreiber Eppendorf N 6511.

2.4.3.2. Beschreibung allgemein: Die Lichttransmission von plättchenreichem Plasma wird mittels eines Photo-

meters aufgezeichnet. Wenn man Aggregationsinduktoren wie Thrombin, Kollagen, ADP oder Adrenalin der Lösung zufügt, hat das einen Anstieg der Transmission zur Folge, wenn die Plättchen aggregieren. Eine Veränderung des Aggregationsverhaltens der Thrombozyten, vor oder nach der Markierung, kann Indikator für eine gestörte Funktionsfähigkeit sein.

Thrombin: Topostasin der Firma La Roche

3000 N.I.H. Einheiten steriles

Thrombin zum Auflösen. 100 ml = 300 IE/ml.

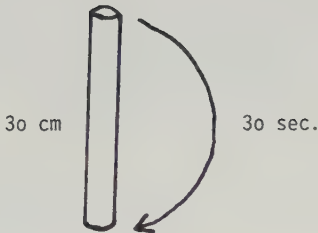
2.4.3.3. Thrombininduzierte Aggregation: 1 ml plättchenreiches Plasma wird in ein vortemperiertes Meßröhrchen pipettiert und der Rührmagnet zugegeben. Das Meßröhrchen wird in den auf 37°C temperierten Aluminiumblock gesteckt und das Photometer auf eine Extinktion von 0,9 eingestellt. Nach Einschalten des Magnetrührers werden mit einer Eppendorf-Pipette in 1minütigen Intervallen jeweils 0,6 IE Thrombin zugesetzt und die Reaktion der Blutplättchen durch den Schreiber registriert.

Dieser Vorgang wird dreimal mit unmarkierten und markierten Thrombozyten wiederholt und die Aggregationskurven verglichen.

2.4.4. Testverlauf: (Abb. 6)

2.4.4.1. unbeschichtete Schläuche: PVC, PUE, Pelle, PuSi,
Si, Si 3140

- Die 30 cm langen Schläuche werden jeweils mit
15 ml plättchenreichem Plasma (Thr.zahl: 850 000/ μ l)
15 ml PRP + Blut-Gemisch (Thr.zahl: 250 000/ μ l)
mittels 20 ml Plastikspritzen ohne Luftkontakt gefüllt, mit Spezialstopfen verschlossen und dann im 37°C-Wasserbad 10 Minuten lang geschwenkt. Die Schläuche werden der Länge nach so gedreht, daß das untere Schlauchende nach 30 Sekunden oben steht.



- Nach 10 Minuten werden die Schläuche geöffnet und das PRP bzw. PRP + Blut-Gemisch verworfen.
- Jeder Schlauch wird dreimal mit phosphatgepufferter isotonischer Kochsalzlösung (pH 7,4) ($10,2 \text{ g Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$; $1,49 \text{ g NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; $1,48 \text{ g NaCl/l}$) gespült.
- An den Schlauchenden werden 3 cm lange Stücke abgetrennt und verworfen.
- Verbleibende Schläuche werden in 12 Teilstücke à 2 cm geschnitten.
- Teilstücke für je 20 Minuten in automatischen Gamma-Probenwechsler der Firma Intertechnique.

2.4.4.2. Beschichtete Schläuche: PUE, Pelle, Si 3140, PuSi

Beschichtung: (nach Lemm et al.)

Einlegen der Schläuche für 24 Stunden in entsprechender Proteinlösung:

Albumin aus Rinderserum Fraktion V MG 67 000

4,5 g/100 ml

γ -Globulin aus Rinderserum lyophil Cohn

Fraktion II

0,6 g/100 ml MG 16 900

Fibrinogen aus Rinderplasma lyophil rein

0,3 g/100 ml

Fa.
Serva
Fein-
bio-
chemica
Heidel-
berg

Plasma aus Rinderplasma physiologisch

2,93 g% Albumin

pH 7,3

0,6 g% Fibrinogen

2,89 g% γ -Globulin

eigene

Herstellung

- Lufttrocknung bei 37°C für 24 h

Verfahren zur Bestimmung der Plättchenadhäsion

siehe Testverlauf 2.4.4.1. unbeschichtete Schläuche.

PROTEINBESCHICHTUNG VON SCHLÄUCHEN

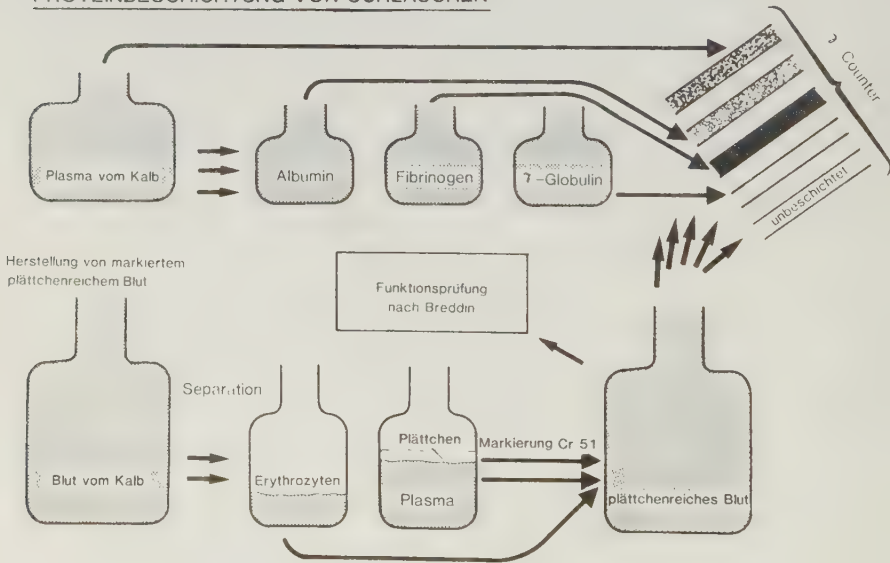


Abb. 6: Graphische Darstellung der Proteinbeschichtungsmethode mit Thrombozytenfunktionsprüfung und Auswertung im γ -Counter nach Blutkontakt.

2.5. In-vitro-Versuche mit Hundeblood (AD 4 + 5)

Bei den Versuchen AD 4 + AD 5 wurden unbeschichtete PUE-, PVC- und Si-Schläuche mit Hundethrombozyten getestet.

2.5.1. Herstellung von Plättchenreichem Plasma analog dem Verfahren von J.F. Mustard (71)

(siehe in-vitro-Versuch Kalb).

Es wurden dazu einer Collie-Hündin (12 kg, 2 J.) 250 ml Blut abgenommen (mit 35 ml ACD-Stabilisator).

2.5.2. Markierung erfolgte nach der Methode von Abrahamson (1).

250 ml Blut mit 500 uCi ^{51}Cr (siehe 2.4.2.)

2.5.3. Funktionsprüfung der unmarkierten und markierten Hundethrombozyten mit dem Universal Aggregometer durch induzierte Aggregation mittels Thrombin (siehe 2.4.3.)

2.5.4. Testverlauf:

Die 30 cm langen Schläuche wurden jeweils mit:

15 ml plättchenreichem Plasma (Thr.zahl 750 000/ μl)

15 ml PRP + Blut-Gemisch (Thr.zahl 250 000/ μl)

mittels 20 ml Plastikspritzen gefüllt, mit Spezialstopfen verschlossen und dann im 37°C-Wasserbad für die Dauer von 10 Minuten geschwenkt. Die Schläuche wurden der Länge nach so gedreht, daß das untere Ende nach genau 30 Sekunden oben stand.

Weiteres Versuchsverfahren analog 2.4.4.

2.6. Ex-vivo-Versuche Kalb: AD 1 + 2 und AD 5

2.6.1. Markierung der Thrombozyten mit ^{51}Cr

Das Separieren und Markieren wurde identisch zu den bei 2.4.1. und 2.4.2. beschriebenen in-vitro-Versuchen ausgeführt (nach J.F. Mustard und Abrahamson) (71, 1).

AD 1 + 2: 500 ml Blut + 500 $\mu\text{Ci } ^{51}\text{Cr}$

AD 5: 500 ml Blut + 2000 $\mu\text{Ci } ^{51}\text{Cr}$

2.6.2. Die Plättchenfunktion nach Bredin (8, 9) wurde schon bei 2.4.3. beschrieben.

Die vollständige Blutmenge (500 ml) mit den markierten Thrombozyten wurde nach abgeschlossenem Markierungsvorgang (3 h) wieder dem Kalb zugeführt.

2.6.3. Zur Thrombozytenüberlebenszeituntersuchung

wurde nach 0', 10', 20', 30', 60', 90', 120', 1 d, 2 d, 3 d - 7 d Blutproben entnommen und die Aktivität im Gamma-Counter gemessen. Diese Untersuchungen wurden zur Kontrolle der Thrombozytenfunktion durchgeführt. Als Meßgröße galt der Thrombozytenabbau.

2.6.4. Flußmessung und konstante Flußeinstellung im Shunt:

Elektromagnetisch kanülierend und mit dem Doppler-Ultraschallgerät der Firma Medtronic (ohne Blutkontakt) wurde in den Versuchen der Volumenstrom des Blutes bestimmt und mit einer Spezialklemme auf einen konstanten Wert eingestellt.

2.6.5. Testverlauf am Shunt: AD 1 + 2 und AD 5

1 h nach Reinjektion der markierten Thrombozyten.

2.6.5.1. Material: unbeschichtete Schläuche Si, Si 314o, PUE, Pelle, PuSi, PVC

Maße:	AD 1 Si-Schlauch:	1m ID: 6,4 mm
	AD 2 Si	
	Si 314o	
	Pelle	60 cm ID: 8 mm
	PuSi	
	AD 5 Si	
	PUE	30 cm ID: 8 mm
	PVC	
	Si	
	Si 314o	
	Pelle	60 cm ID: 8 mm
	PuSi	
	PVC	

Expositionszeit: AD 1: 2 min
AD 2: 3 min, 10 min
AD 5: a) 1 h
b) 10 min

Fluß: AD 1: 0,7 l/min
AD 2: 0,55 l/min
AD 5: 0,55 l/min

Die Versuche wurden immer zur gleichen Tageszeit durchgeführt: zwischen 13.00 und 14.00 Uhr.

2.6.5.2. Füllung der dampfsterilisierten (120°C, 1h) Kunststoffschläuche mit physiologischer Kochsalzlösung.

- Unterbrechung des Blutstroms im Shunt mit 2 chirurgischen Klemmen.
- Einbringen der Testschläuche mittels handelsüblicher (z.B. für Herz-Lungen-Maschinen) Schlauchkonnectoren, unter vollständiger Vermeidung von Luft-einflüssen.
- Öffnen der Klemmen für die entsprechende Expositionszeit. Abb. 7.

- Abnahme der Schläuche und Spülung mit phosphat-gepuffter isotonischer Kochsalzlösung (siehe 2.4.4.1.) (Abb. 8).
- An jedem Schlauchende werden 3 cm lange Stücke abgetrennt und verworfen.
- Die Schläuche werden in 2 cm lange Teilstücke geschnitten.
- Teilstücke für je 20 Minuten in automatischen Gamma-Probenwechsler der Firma Intertechnique.

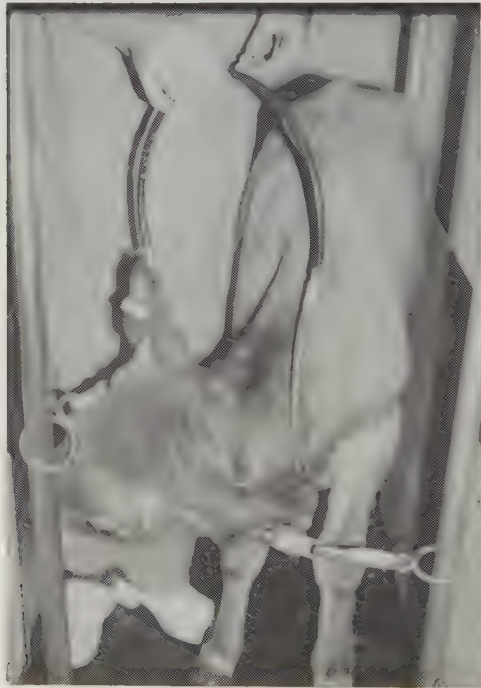


Abb. 7: Das Kalb mit dem extracorporalen AV-Shunt und dazwischengeschaltetem Testschlauch.

Abb. 8: Abnahme des Testschlauchs mittels chirurgischer Klemmen.



3. Ergebnisse

3.1. In-vitro-Versuche Kalb (72)

3.1.1. Funktionsfähigkeit der markierten Thrombozyten

Induzierte Aggregation mittels Thrombin: In Bezug auf Ablösemenge, Reaktionszeit und Neigungswinkel treten keine wesentlichen Unterschiede zwischen markierten und unmarkierten Thrombozyten auf.

Thrombin: Plättchenreiches Plasma mit einer Thrombozytenzahl von 350 000/ μ l, Aggregation nach 2 Minuten und Zugabe von 1,2 IE Thrombin (Abb. 9a und 9b).

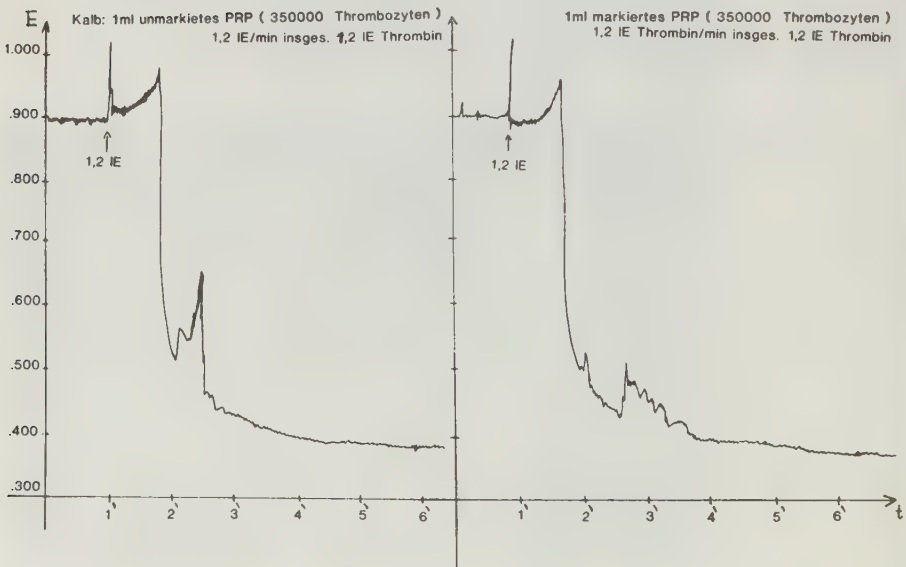


Abb. 9a: Thrombininduzierte Aggregation bei unmarkierten Kälberthrombozyten, aufgezeichnet im Universal-Aggregometer mit Schreiber.

Abb. 9b: Thrombininduzierte Aggregation bei ^{51}Cr -markierten Kälberthrombozyten.

3.1.2. Thrombozytenadhäsion

3.1.2.1. Makroskopisch: An keinem der Schläuche wurden Ablagerungen beobachtet.

3.1.2.2. Radioisotopische Quantifizierung bei plättchenreichem Plasma (Thr.zahl 850 000/ μ l):

560 Proben wurden untersucht, doch aufgrund der großen Streuung der Werte und der "peaks" wurden diese Ergebnisse nicht verwertet (s. Diskussion).

Das Beispiel der Auswertung im γ -Counter von AD 6 (PVC, PUE, Si, Si 3140, PuSi, Pelle) soll die Unregelmäßigkeiten der Werte zeigen.

Die mittlere Streuung besteht teilweise aus mehr als + 150 %. Diese Ergebnisse sind stellvertretend für alle anderen Werte bei PRP (Tab. 2).

6	53735		
7	6810		
8	5820		
9	7656		
10	7952		
11	6916		
12	5390		
13	4502		
14	6960		
15	16104		
16	5050		
17	2431	Leerwert	
18	4117		
19	3902		
20	4780		
21	6861		
22	16259		
23	6273		
24	4905		
25	3800		
26	3969		
27	7353		
28	3265		
29	3412	Leerwert	
30	3903		
31	3902		
32	2830		
33	6594		
34	5325		
35	6477		
36	5756		
37	4672		
38	3414		
39	6053		
40	3582		
41	2378	Leerwert	
42	5686		
43	3240		
44	6193		
45	14497		
46	3480		
47	3695		
48	6956		
49	3499		
50	4332		
51	3495		
52	4016		
53	2527	Leerwert	
54	7086		
55	9768		
56	7398		
57	5735		
58	18577		
59	4882		
60	5521		
61	4799		
62	3533		
63	3228		
64	3217		
65	2589		
66	2439	Leerwert	
67	3226		
68	3387		
69	6336		
70	4331		
71	8647		
72	8479		
73	11057		
74	6858		
75	10854		

Tab. 2: Ausschnitt eines Registrierbogens aus dem γ -Counter bei AD 6. Messung der gesteigerten radioaktiven Impulsrate der Schlauchproben nach Kontakt mit plättchenreichem Plasma (PRP).

3.1.2.3. Radioisotopische Quantifizierung bei plättchenreichem Plasma + Blut (Thr.zahl 250 000/μl):

560 Proben wurden ausgewertet. Die Ergebnisse in Thrombozyten/cm² der einzelnen Materialien, unbeschichtet und beschichtet, Standardabweichung s_x , in absoluten Werten und Prozent, zeigt Tab. 3.

		PVC	PU	Pelle	PuSi	Si	Si 3140
unbeschichtet	a	36	36	36	36	36	36
	b	32 ±18	140±45	19 ±7	12 ±4	160 ±36	130 ±36
	c	±55	±32	±35	±34	±22	±28
albumisiert	a		36	36	36		36
	b		15 ±3	12 ±2	12 ±3		35 ±8
	c		±16	±18	±28		±24
globulinisiert	a		12	12	12		12
	b		19 ±12	10 ±4	9 ±5		50 ±32
	c		±63	±38	±51		±63
fibrinogenisiert	a		12	12	12		12
	b		10 ±5	6 ±2	8 ±5		10 ±5
	c		±51	±27	±67		±47
prae plasma	a		24	24	24		24
	b		22 ±7	20 ±6	13 ±4		30 ±14
	c		±30	±30	±27		±46

a : n Anzahl der Proben

b : s Standardabweichung

c : Standardabweichung in Prozent

Tab. 3: Zusammenstellung aller Versuchsergebnisse von Schlauchproben nach in-vitro-Kontakt mit Kälberblut. Angaben in Thrombozytenzahl pro cm², Standardabweichung, absolut (b) und in Prozent (c).

b- $\bar{x} \pm s$

3.1.2.4. Die ersten Messungen von anhaftenden Thrombozyten unternahmen wir an nicht praeproteinisierten Kunststoffen. Bei der Auswertung von insgesamt 216 Proben ergaben sich Thrombozytenadhäsionszahlen von $160 \text{ Thr./cm}^2 \pm 36$ bei Silastic, $140 \pm 45 \text{ Thr./cm}^2$ bei PUE, $130 \pm 36 \text{ Thr./cm}^2$ bei Silastic 3140, $32 \pm 18 \text{ Thr./cm}^2$ bei PVC, $19 \pm 7 \text{ Thr./cm}^2$ bei Pelle, $12 \pm 4 \text{ Thr./cm}^2$ bei PuSi.

Abb. 10 zeigt den Vergleich aller nicht praeproteinisierten Materialien von den Versuchen AD 4 bis AD 8.

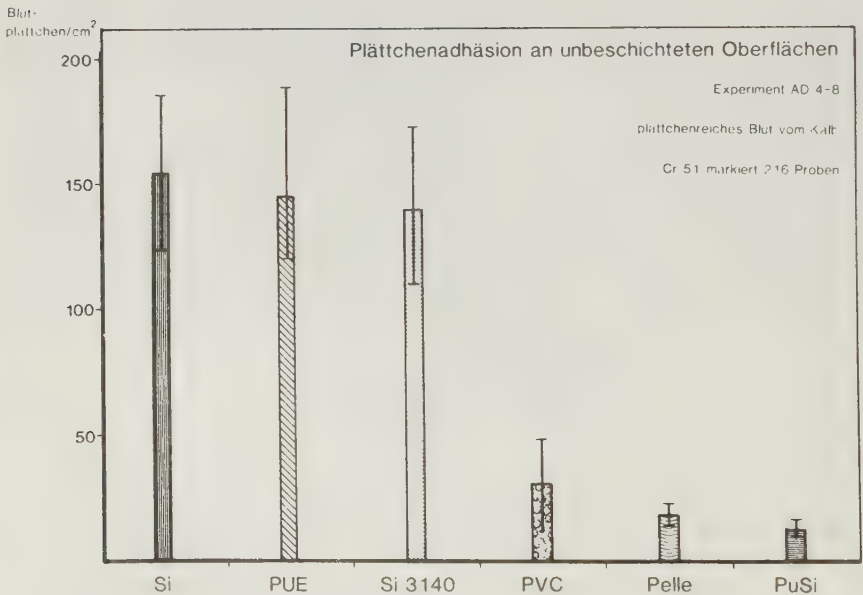


Abb. 10

3.1.2.5. Um die Wirkung von Plasmabeschichtung auf die Thrombozytenadhäsivität an Kunststoffen zu testen, führten wir diese in AD 7 und AD 8 bei PUE, Si 3140, Pelle und PuSi aus.

Die ausgeprägteste Veränderung der angelagerten Thrombozytenzahl erkennt man bei PUE, wobei sich beim unbeschichteten Material 140 Thr./cm² und beim plasmabeschichteten PUE 22 Thr./cm² anlagerten. Bei Si 3140 lagen die Werte des neutralen Schlauches bei 130 Thr./cm² und nach Plasmabeschichtung bei 30 Thr./cm². An Pelle hafteten vor Beschichtung 19 Thr./cm², danach 20 Thr./cm². Dieser Vergleich ergab beim unbehandelten PuSi 12 Thr./cm² und beim plasmabeschichteten PuSi 13 Thr./cm² (Standardabweichung s. Tab. 3). Es bestehen demgemäß unterschiedliche Einflüsse der Plasmabeschichtung bei PUE und Si 3140 einerseits und Pelle und PuSi andererseits (Abb. 11).

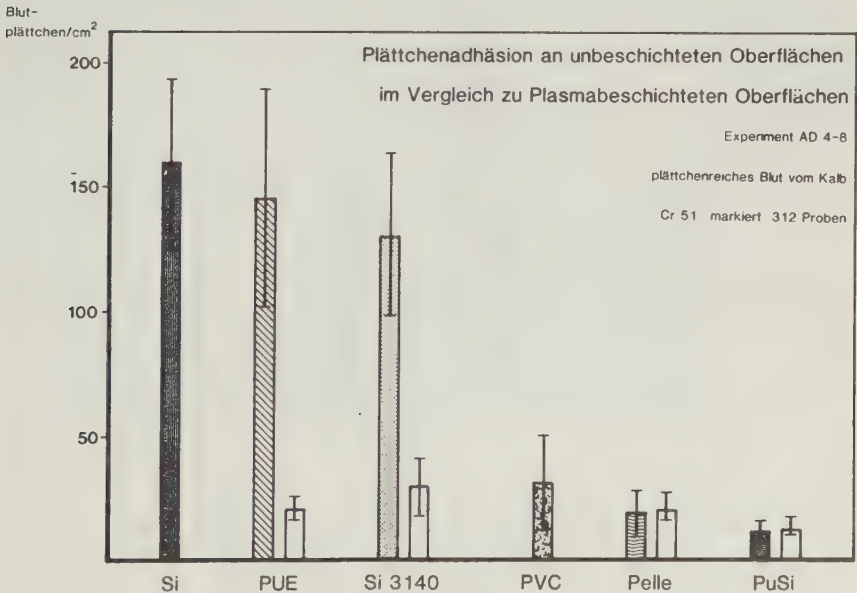


Abb. 11

3.1.2.6. Wie einzelne Eiweißbeschichtungsformen auf die Thrombozytenadhäsion von Kunststoffen wirken, zeigen die Versuche von AD 6, 7, 8, bei denen die Schläuche (336 Proben) entweder mit Albumin, Globulin, Fibrinogen oder Plasma beschichtet wurden. Diese Versuche wurden bei PUE, Si 3140, Pelle und PuSi durchgeführt. Die Ergebnisse zeigt. Tab. 3

Innerhalb der Materialien ergab unterschiedliche Proteinbeschichtung keine aussagekräftigen Unterschiede für die Thrombozytenadhäsion (s. Abb. 12).

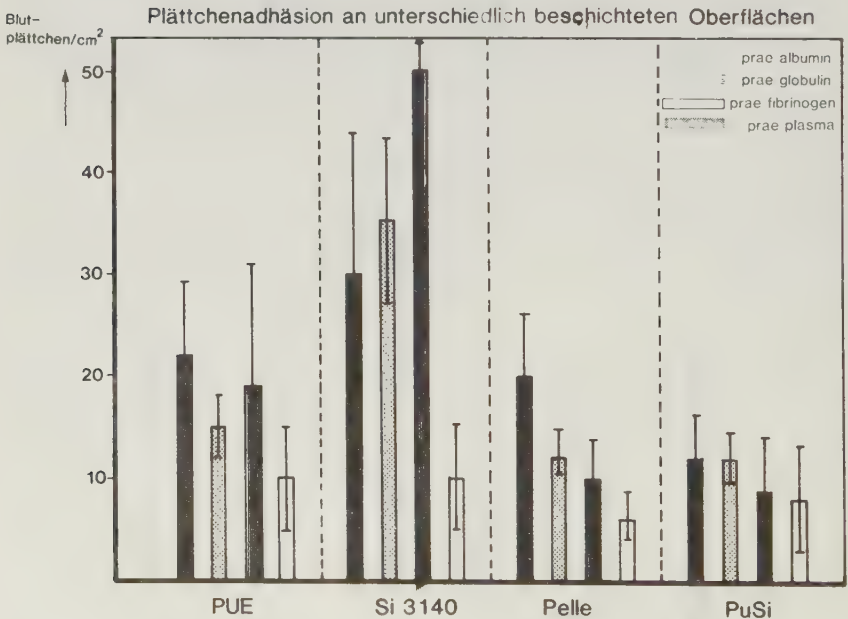


Abb. 12

3.1.2.7. Vergleich aller Meßergebnisse von den Versuchen AD 4 - AD 8 in vitro mit Kälberblut. Ergebnisse Tab. 3.
560 Proben wurden ausgewertet, und es ist erkennbar,

daß eine Praeproteinisierung mit Albumin, Fibrinogen, γ -Globulin oder Plasma generell bei PUE und Si 3140 eine Abnahme der anhaftenden Thrombozyten bewirkte. Bei PUE fällt die Thrombozytenzahl von 140 Thr./cm² (unbehandelter Kunststoff) auf 15 Thr./cm² (prae-Albumin), 19 Thr./cm² (prae-Globulin), 10 Thr./cm² (prae-Fibrinogen) oder 22 Thr./cm² (prae-Plasma). Bei Si 3140 ergibt sich ein Abfall der anhaftenden Thrombozyten nach Proteinisierung von 130 Thr./cm² (unbehandelter Kunststoff) auf 35 Thr./cm² (prae-Albumin), 50 Thr./cm² (prae-Globulin), 10 Thr./cm² (prae-Fibrinogen) oder 30 Thr./cm² (prae-Plasma). Geringe bis gar keine Unterschiede bestehen bei Pelle und PuSi. Die Praeproteinisierung bewirkte in keinem Fall einen Anstieg der Thrombozytenadhäsion (s. Abb. 13).

Blut-plättchen/cm² Plättchenadhäsion an unbeschichteten und unterschiedlich beschichteten Oberflächen

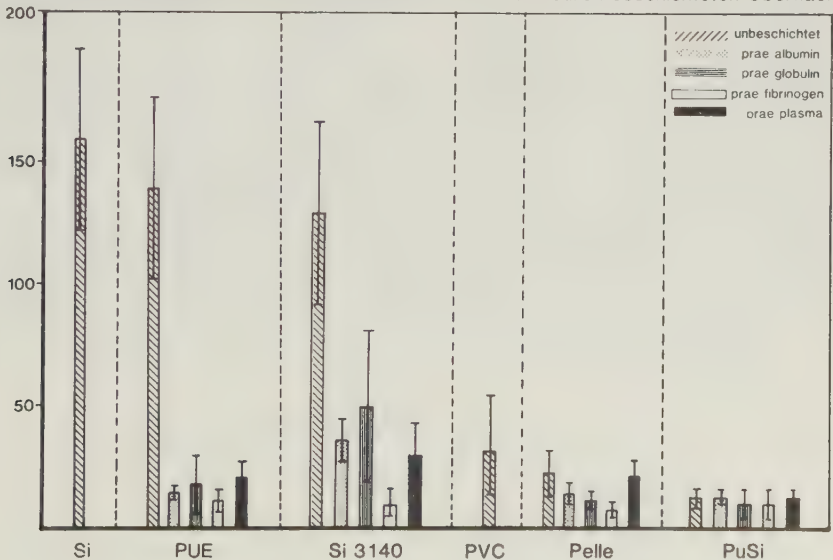


Abb. 13

3.2. In-vitro-Versuche Hund

3.2.1. Die Funktionsfähigkeit zeigte in Bezug auf die induzierte Aggregation keine wesentlichen Unterschiede zwischen markierten und unmarkierten Thrombozyten. Thrombininduzierte Aggregation bei plättchenreichem Plasma (250 000 Thr./ μ l nach Zugabe von 1,2 IE Thrombin nach 30 Sekunden (Abb. 14a und 14b).

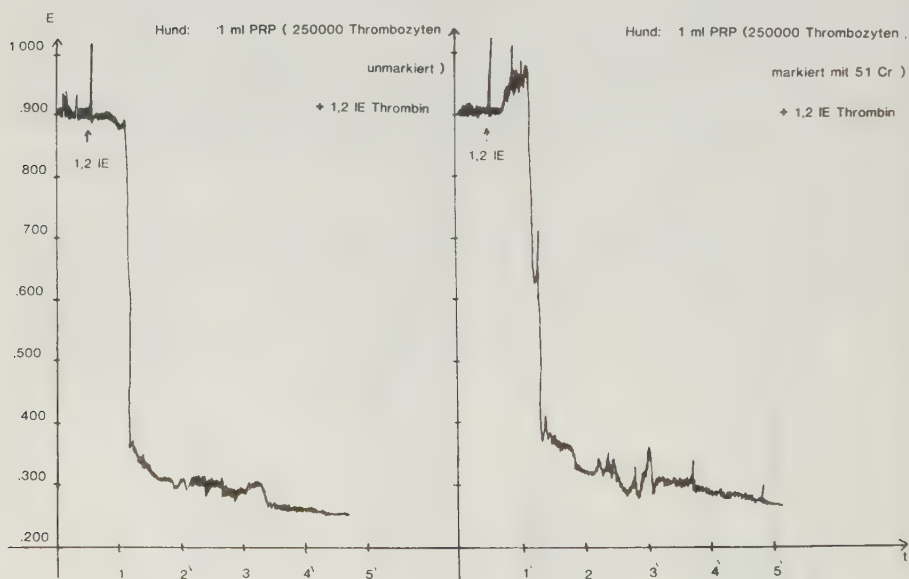


Abb. 14a: Thrombininduzierte Aggregation bei unmarkierten Hundethrombozyten, aufgezeichnet mit Universal-aggregometer und Schreiber.

Abb. 14b: Thrombininduzierte Aggregation bei ^{51}Cr markierten Thrombozyten.

3.2.2. Thrombozytenadhäsion

3.2.2.1. Makroskopisch: keine Anlagerungen an den Schläuchen

3.2.2.2. Radioisotopische Quantifizierung

3.2.2.3. Wie beim Kalb waren die Ergebnisse mit reinem plättchenreichem Plasma, die man an extremen "peaks" erkennen konnte, nicht verwertbar.

Thrombozytenzahl 750 000/ μ l.

3.2.2.4. Plättchenreiches Plasma-Blut-Gemisch

Thrombozytenzahl 250 000/ μ l.

Die Ergebnisse zeigt Tab. 4. Abb. 15 gibt einen graphischen Vergleich der Thrombozytenadhäsionszahlen für PVC, PUE und Si. Nach Auswertung von 58 Schlauchproben in vitro ergab sich für PVC 85 Thr./cm², für PUE 110 Thr./cm² und für Si 70 Thr./cm².

		PVC	PUE	Si
AD-4	a	12	12	12
	b	30 $\pm$ 20	20 $\pm$ 16	43 $\pm$ 13
	c	$\pm$ 66	$\pm$ 78	$\pm$ 31
AD-5	a	12	12	12
	b _s	140 $\pm$ 103	197 $\pm$ 60	103 $\pm$ 56
	c	$\pm$ 75	$\pm$ 30	$\pm$ 54
zus.	a	24	24	24
	b _s	85 $\pm$ 55	110 $\pm$ 90	70 $\pm$ 30
	c	$\pm$ 65	$\pm$ 81	$\pm$ 43

a : n Anzahl der Proben

b : s : Standardabweichung

c : Standardabweichung in Prozent %

Tab. 4: Zusammenstellung der Versuchsergebnisse von Schlauchproben nach in-vitro-Kontakt mit Hundeblood. Angaben in Thrombozyten pro cm², Standardabweichung absolut (b) und in Prozent (c); $b = \bar{x} \pm s$.

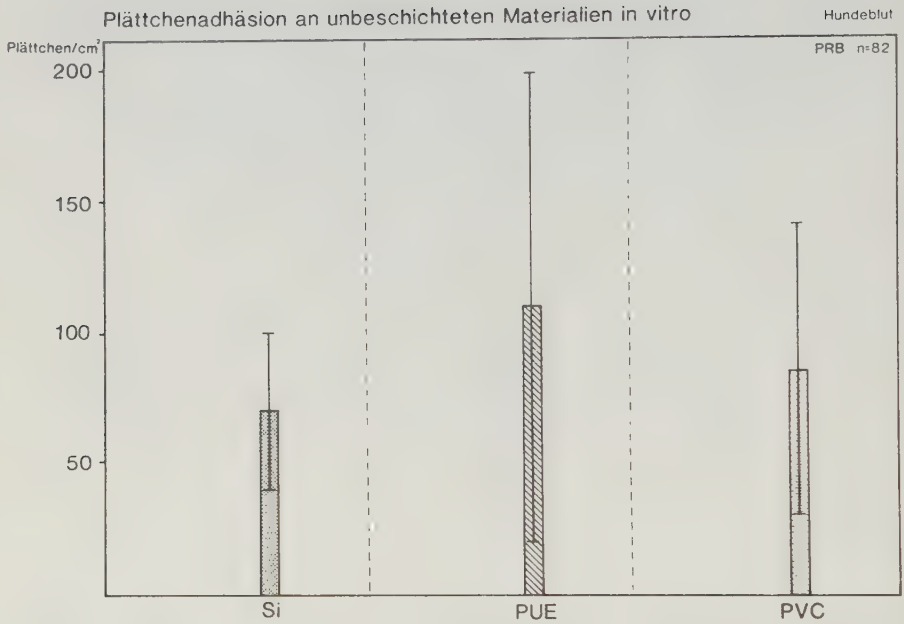


Abb. 15:

Vergleich der Adhäsionszahlen von Hundethrombozyten nach in-vitro-Kontakt mit Si-, PUE-, und PVC-Schlauchproben.

3.2.2.3. Abb. 16 zeigt den Vergleich zwischen Thrombozytenadhäsion von Kalb und Hund bei Si, PUE und PVC in vitro. Bei Si und PUE lagen die Werte für das Kalb mit 160 und 140 im Vergleich zum Hund mit 70 und 110 Thr./cm². höher.

An PVC lagerten sich mehr Hundethrombozyten (85 Thr./cm²) an als beim Kalb (32 Thr./cm²).

Die Thrombozytenkonzentration im PRP + Blut-Gemisch waren beim Hund wie beim Kalb mit 250 000 Thr./μl gleich.

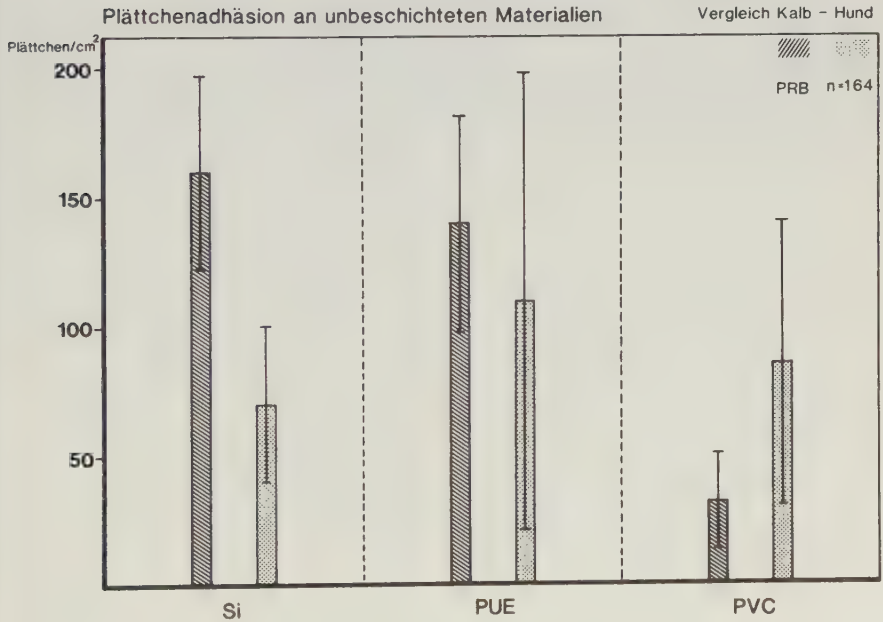


Abb. 16: Vergleich der Thrombozytenadhäsion zwischen Kalb und Hund bei Si, PUE, PVC.

3.3. Ex-vivo-Versuche Kalb

3.3.1. Funktionsfähigkeit: Kein Unterschied zwischen unmarkierten und markierten Thrombozyten in Bezug auf Verhalten bei thrombininduzierter Aggregation.

3.3.2. Prüfung der Thrombozytenüberlebenszeit (Unger et al., 1980) (74). Die Kinetik des Abbaus von ^{51}Cr markierten Thrombozyten bei dem Versuchstier mit AV-Shunt zeigte sich im Vergleich zur Norm mit unmarkierten Thrombozyten relativ unverändert. Die Plättchenüberlebenszeit (Halbwertszeit) betrug:
 $198 \times 10^3 \text{ Thr./mm}^3/\text{Tag} \pm 6 \%$.

3.3.3. Thrombozytenadhäsion

3.3.3.1. Makroskopisch: keine Anlagerungen

3.3.3.2. Radioaktive Quantifizierung: Keine Thrombozytenadhäsion auf den Schlauchsegmenten (s. Tab. 5). Berechnung des Leerwertes aus 43 Meßproben ergab 2399 ± 60 cp 20m (Impulse pro 20 Min.). Beispiel 1: Die 60 cm PUE-Schläuche, die 10 min. im Schlauch verblieben waren, ergaben bei Auswertung von 26 Proben eine Impulsrate von 2395 ± 50 cp 20m. Dies bedeutet keine verifizierbare Änderung der Impulsrate und somit keine berechenbare Anlagerung von Thrombozyten.

Beispiel 2: 60 cm Si 3140 Schlauch, 10 min. Expositionszeit, Leerwert 2399 ± 60 cp 20m, Meßwert 2455 ± 73 cp 20 m - keine nachweisbare Thrombozytenadhäsion.

AD 1 und AD 5 ergaben die Shuntversuche entsprechende Ergebnisse (vgl. Diskussion).

n		t	C ₅	J ₅	1ndv 1-10	AD-2	21.1.80
1	20.00	2434	2633	2639	Leer	17	30
2	20.00	2408	2605	2609			
3	20.00	2271	2433	2498	PUE 10'	n = 26 x̄ = 2395	
4	20.00	2489	2667	2652			
5	20.00	2343	2515	2442			
6	20.00	2359	2532	2510			
7	20.00	2358	2530	2515			
8	20.00	2358	2534	2514			
9	20.00	2408	2596	2636			
10	20.00	2338	2512	2468			
11	20.00	2371	2564	2550			
12	20.00	2307	2479	2452			
13	20.00	2485	2609	2531			
14	20.00	2424	2603	2572			
15	20.00	2438	2638	2592			
16	20.00	2369	2553	2512			
17	20.00	2512	2705	2561			
18	20.00	2403	2614	2496			
19	20.00	2456	2627	2568			
20	20.00	2383	2545	2486			
21	20.00	2401	2584	2532			
22	20.00	2445	2612	2531			
23	20.00	2407	2571	2492			
24	20.00	2405	2604	2529			
25	20.00	2482	2679	2535			
26	20.00	2297	2473	2443			
27	20.00	2391	2544	2536	Leer	x̄ = 2399	
28	20.00	2361	2556	2594			
29	20.00	2376	2563	2431	Silastic 3140	n = 26 x̄ = 2455	
30	20.00	2716	2697	2547			
31	20.00	2464	2643	2512			
32	20.00	2316	2539	2433			
33	20.00	2473	2652	2574			
34	20.00	2642	2644	2743			
35	20.00	2370	2586	2625			
36	20.00	2517	2730	2628			
37	20.00	2427	2617	2574			
38	20.00	2398	2567	2562			
39	20.00	2437	2627	2602			
40	20.00	2369	2576	2505			
41	20.00	2283	2570	2495			
42	20.00	2438	2610	2566			
43	20.00	2466	2636	2571			
44	20.00	2356	2551	2523			
45	20.00	2450	2656	2694			
46	20.00	2544	2730	2661			
47	20.00	2367	2546	2474			
48	20.00	2319	2533	2535			
49	20.00	2452	2636	2582			
50	20.00	2419	2601	2567			
51	20.00	2499	2702	2593			
52	20.00	2671	2871	2735			
53	20.00	2498	2702	2714			
54	20.00	2478	2697	2626			
55	20.00	2453	2640	2599	Leer	x̄ = 2399	
56	20.00	2346	2554	2589			

Tab. 5: Ausschnitt eines Registrierbogens aus dem γ-Counter bei AD 2. Messung der radioaktiven Impulsrate von PUE und Si 3140 bei Schlauchproben nach Exposition von 10 min. im AV-Shunt.

4. Diskussion

Die Entwicklung blutverträglicher, chirurgisch verwendungsfähiger Kunststoffe stellt die Beseitigung des Problems, die Thrombose, in den Vordergrund, neben Embolie, Hämolyse und Thrombozytopenie. Die Gerinnung kann mechanisch, d.h. durch unphysiologische Hämodynamik oder/und Oberflächen induziert sein. Anhand experimenteller Erfahrungen konnten die Ursachen der Thrombozytenadhäsion analysiert werden, und daraus abgeleitete Hypothesen führten zu einer Reihe unterschiedlicher Oberflächenstrukturen, die für den klinischen Gebrauch erfolgversprechend sind (23, 47, 50). Die vorliegenden Ergebnisse können herangezogen werden, um die verwendeten Kunststoffe in ihrem Verhalten gegenüber Blutplättchen zu beurteilen und die Auswirkungen von Präproteinisierung zu bewerten. Betrachtet man die durchgeführten Versuche, so muß beachtet werden, daß diese Versuchsreihe dadurch entstanden ist, daß bereits vorhandene Biomaterialien auf ihre Blutverträglichkeit geprüft werden sollten. Den realen Erfordernissen entsprechend, wurde nach Methoden gesucht (in-vitro-Kalb, in-vitro-Hund, ex-vivo-Kalb), um schnell aussagekräftige und reproduzierbare Ergebnisse über die Thrombogenität der Materialien zu finden. Daher mußte ein Kompromiß zwischen der Intensität von Grundlagenforschung und den praktischen Erfordernissen gefunden werden. Die verwendeten Versuchsmethoden müssen weiteren Erprobungen unterzogen werden, um sie als wissenschaftlich anerkannte, technisch einwandfreie screening-Methoden zur Biomaterialtestung heranzuziehen. Die Resultate der in-vitro-Versuche mit Kälberblut lassen folgende quantitative Beurteilung zu:

gut: PuSi, Pelle, PVC

weniger gut: Si, PUE, Si 3140

Auffallend war, daß sich an die unbehandelten, industriell gefertigten Schläuche aus Si und PUE die meisten Thrombozyten anlagerten (Abb. 10, Tab. 3). Eine zusätzliche Lö-

sungsbeschichtung des Materials mit dem gleichen Polymer, wie z.B. bei Pellethane (PUE) mit Pellethane (Pelle) ergab einen beträchtlichen Abfall der anhaftenden Thrombozyten (PUE: 140 Thr./cm², Pelle: 19 Thr./cm²). Analog dazu lagerten sich nach Beschichtung des rohen Silastic mit Si 3140 weniger Thrombozyten an (Si: 160 Thr./cm², Si 3140: 130 Thr./cm²). Voraussichtlich wird durch die Lösungsbeschichtung die Oberflächenrauheit des Materials herabgesetzt.

Zusätzlich wurde der Einfluß von Proteinbeschichtungen auf die Adhäsion von Thrombozyten untersucht. Festgestellt wurde, daß eine Praeproteinisierung bei den "guten" Materialien, wie Pelle und PuSi, kaum oder gar keine Auswirkung auf die Thrombozytenadhäsion hat. Bei Si 3140 und PUE verbesserten sich dagegen die thrombogenen Eigenschaften nach Proteinbeschichtung erheblich, jedoch ohne die Qualität von Pelle oder PuSi zu erreichen. Dadurch ließe sich die Vermutung ableiten, daß der Einfluß der Praeproteinisierung von der Beschaffenheit des Kunststoffes abhängt. Die Glätte der Oberfläche scheint in direktem Zusammenhang mit der Blutverträglichkeit zu stehen. Je weniger Thrombozyten sich an den unbehandelten Kunststoff anlagern, desto geringer sind die Auswirkungen der Praeprotenisierung. An PuSi lagerten sich sowohl vor wie nach Eiweißbeschichtung nicht mehr als 12 ± 4 Thr./cm² an.

Weiterhin wurde in den Versuchen festgestellt, daß unabhängig von der Art der Proteinbeschichtung, Albumin, γ -Globulin, Fibrinogen oder Plasma immer zu einer Verbesserung der Blutkontakteigenschaften führte. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Lyman, Lee et al. (47, 48), die herausgefunden haben, daß Albumin die Adhäsivität von Thrombozyten an Kunststoffoberflächen herabsetzte, während γ -Globulin und Fibrinogen sie heraufsetzen würde. Auf der anderen Seite kamen A.W. Neumann et al. (56, 57) bei ihren in-vitro-Versuchen zu den entsprechenden Ergebnissen wie wir:

Die Beschichtung von Glas und Polymeren (Si, Nylon, Polystyrol) mit Proteinen bewirkte, daß sich generell weniger Thrombozyten anlagerten. In der Art der Proteinbeschichtung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede: γ -Globulin: 43 ± 17 , Albumin: 26 ± 16 , Fibrinogen: 38 ± 12 (Relativwerte ohne Größenangabe) (57).

Die Versuche wurden mit Schweineblut ausgeführt, und die anhaftenden Thrombozyten wurden mikroskopisch gezählt.

Ein objektiverer Vergleich von Forschungsergebnissen läßt sich jedoch erst durchführen, wenn die Forderungen der N.I.H. (National Institute of Health, USA) nach Vereinheitlichung, Reproduzierbarkeit und Standardisierung von experimenteller Forschung auf dem Gebiet der Blutkontaktstoffe weltweit durchgesetzt werden (53). Die Vielzahl der verschiedenen Versuchsgrundlagen, -methoden und -tiere läßt eine direkte Vergleichbarkeit im Moment nicht zu.

Als brauchbare in-vitro-Methode, besonders für schlauchförmige Proben, mit befriedigender physikochemischer Charakterisierbarkeit und guter Standardisierbarkeit hat sich die Methode der Thrombozytenadhäsionsmessung nach radioaktiver Markierung bewährt. Dieses Verfahren läßt sich gut reproduzieren und bedarf keines großen technischen und zeitlichen Aufwands. Die Methode und Versuchsanordnung zur Ermittlung der antithrombotischen Eigenschaften von Kunststoffen, wird den in der Einleitung dargelegten Bedingungen, die ein in-vitro-Test erfüllen muß, um Aussagekraft zu haben, weitgehend gerecht.

- Denn:
1. Die Blutmenge (15 ml) wird durch das beschriebene Verfahren konstant gehalten.
 2. Die Kunststoffoberfläche, die in Kontakt mit Blut kommt, ist durch die genormten Schlauchabschnitte (Pelle, PuSi, PUE, PVC) konstant.
 3. Durch eine konstante Rotation wird einerseits ein Blutfluß simuliert, die Sedimentation von

Blutbestandteilen verhindert und andererseits ein größtmöglicher Kontakt zwischen Thrombozyten und Testoberfläche gewährleistet.

5. Die Temperatur ist mit 37°C konstant.

Es konnten jedoch nur die Ergebnisse aus den Versuchen mit plättchenreichem Blut verwendet werden. Die Thrombozytenkonzentration (850 000 Thr./ μ l) in plättchenreichem Plasma war so hoch, daß es möglicherweise zu Spontanaggregation kam, die in den Ergebnissen zu hohen Schwankungen führten (150 %).

Es ergaben sich in der Auswertung im γ -Counter sogenannte "peaks" von 10 000 - 20 000 cp 20 m bei "Durchschnittswerten" um 5000 - 6000 cp 20 m. Das verwendete PRP-Blut- Gemisch wurde bei Thrombozytenkonzentrationen von 250 000 Thr./ μ l gehalten, was nach Schiessler et al. (66) dem durchschnittlichen physiologischen Normalwert für Kälberblut entspricht. Die Verwendung von Kälbern liegt darin begründet, daß seit mehreren Jahren international in der kardiovaskulären Forschung das Kalb als Versuchstier vermehrt herangezogen wird (14, 27, 30, 31, 42, 43, 51, 52, 66, 70, 71, 74, 75). Leichte Beschaffbarkeit, dem Menschen vergleichbares Gewicht, anatomische Verhältnisse und gewisse Übereinstimmungen in den Flüssigkeitskompartimenten, den bio-chemischen, hämatologischen und gerinnungsphysiologischen Werten stehen dafür. Bei vergleichenden Studien zwischen verschiedenen Tierarten und dem Menschen wurde von Grabowski et al. (26, 27) festgestellt, daß sich die Thrombozytenadhäsionszahlen von Menschen und Kälbern ähneln, wohingegen sich Hunde- und Kaninchenthrombozyten von menschlichen sehr unterscheiden. Um das Reaktionsverhalten der Hundeblutplättchen bei Kunststoffkontakt mit dem der Kälberplättchen zu vergleichen, wurden 2 in-vitro-Versuchsreihen mit Hundeblut (AD 4 und AD 5) durchgeführt, da bis heute der Hund in vergleichbaren Untersuchungen bevorzugt wurde. Es wurden dabei keine Unterschiede zwischen Hund und Kalb festgestellt, wobei jedoch zwei Versuche mit 82 Proben nicht für eine repräsentative Aussage reichen. Bei Grabowski et al. (27) lag die Zahl

der anhaftenden Thrombozyten (elektronenmikroskopisch ausgewertet, absolute Werte) nach einer Expositionszeit von 10 min. mit einer Scherrate von 986 sec^{-1} für Mensch und Kalb bei Avcothane⁵¹ (polyether-urethane-polydimethylsiloxane-Blockcopolymer) bei 100 Thr./mm^2 . Dies ist mit den Ergebnissen von AD 4 bis 8 für PuSi vergleichbar. Für Hundethrombozyten fand Grabowski bei den gleichen Ausgangsbedingungen Adhäsionszahlen von $27\,000 \text{ Thr./mm}^2$ heraus, was entschieden über den Werten von AD 4 und AD 5 liegt. Beim direkten Vergleich ist zu beachten, daß die Ergebnisse der Auswertung von radioaktiv markierten Thrombozyten Relativangaben sind, da nur die markierten Thrombozyten gezählt werden und der Markierungsgrad durchschnittlich bei 10 - 15 % liegt. Zur Beurteilung von Biomaterialien ist die Methode der radioaktiven Markierung geeignet, da ein quantitativer und qualitativer Vergleich bei gleichen Ausgangsbedingungen möglich ist, und zudem dieses Verfahren schnell und relativ einfach durchzuführen ist.

Eine höhere Aussagekraft wurde von den ex-vivo-Testen am Shuntkalb erwartet. Bei einem Blutvolumen von 5 - 6 Litern und der Zugabe von 60 ml plättchenreichem Plasma ($10^6 \text{ Thr./}\mu\text{l}$) mit 15 % markierten Thrombozyten ist die Verteilung der markierten Blutplättchen so stark, daß bei Expositionszeiten bis 1 h (AD 5) und tolerierbarer Drosselung des Blutflusses im Shunt es zu keiner meßbaren Anhaftung von markierten Thrombozyten im Testschlauch kam. Eine Zugabe höherer Aktivität von ⁵¹Cr (bis zu 2 mCi), um die Anzahl der markierten Blutplättchen zu erhöhen, erbrachte keine meßbare Aktivitätssteigerung in den Schlauchproben (AD 5). Eine weitere Erhöhung der ⁵¹Cr-Zugabe konnte aus Gründen des Strahlenschutzes für Tier und Mensch nicht erwogen werden. Eine Möglichkeit, dieses ex-vivo-Verfahren zur Biomaterialtestung anzuwenden, besteht darin, das Gesamtblutvolumen zu verkleinern, d.h. den Versuch bei einem kleineren Tier (Hund, Schwein, Katze) durchzuführen.

Alle erwähnten Versuche lassen erkennen, wie viele Faktoren für die Blutverträglichkeit von Biomaterialien eine Rolle spielen. Es steht außer Zweifel, daß mit der Thrombozyten-

adhäsionsmessung nur ein Teilbereich der Blutkompatibilitäts-testung formuliert werden kann, da zusätzliche Aspekte, wie z.B. die Biodegradation (42), die auftritt, wenn Materialien für längere Zeit im Organismus verbleiben, und Probleme der mechanischen Dauerbelastung grundsätzlich mitberücksichtigt werden müssen. Zieht die Entwicklung von blutverträglichen Kunststoffoberflächen dahin, daß die physiologische Beschaffenheit natürlicher Oberflächen imitiert wird (50), so blieben noch viele Fragen ungelöst. Bisher wurde nur so vorgegangen, daß Kunststoffe unter anderem entweder proteinisiert oder heparinisiert wurden; Kombinationen wurden jedoch nicht vorgenommen.

Einen interessanten Weg geht auch die Entwicklung von mit Zellkulturen beschichteten Kunststoffen (59). Sie ist aber mit den Problemen behaftet, daß bislang nur poröse Kunststoffe erfolgreich verwendet werden können, was einen Gebrauch für künstliche Herzklappen oder pneumatisch betriebene Blutpumpen ausschließt. Außerdem kann nicht verhindert werden, daß die Monolayer unregelmäßig weiterwachsen, so daß es zu Verdickungen und Ernährungsstörungen kommt, was wiederum zur Folge hat, daß die Teile fibrosieren und absterben.

Zwischen der Feststellung einer Gerinnungszeitverlängerung durch siliconisiertes Glas (65) bis zur Entwicklung von mit lebensfähigen Zellkulturen beschichteten Kunststoffoberflächen steht ein Zeitraum von kaum mehr als 20 Jahren, jedoch läßt sich eine Vorhersage künftiger Entwicklungsrichtungen schwer machen. Im Moment zeichnen sich zwei Schwerpunkte in der Biomaterialienforschung ab. Auf der einen Seite wird versucht, neue Kunststoffmaterialien für den Langzeitblutkontakt zu entwickeln, die nicht zusätzlich bearbeitet werden müssen. Auf der anderen Seite sucht man nach Möglichkeiten, herkömmliche Materialien so zu beschichten, daß ihre Blutverträglichkeit noch verbessert wird, z.B. mit Proteinen. Nach den durchgeführten Versuchen kann man sagen, daß z.B. Pelle und PuSi aufgrund ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften bemerkenswerte Antithrombogenität besitzen. Sie sind

unabhängig von einer Proteinbeschichtung, die im Blutstrom einer Erosionsgefahr ausgesetzt ist; außerdem erscheint bei ihrer Anwendung eine Behandlung mit Antikoagulantien nicht erforderlich, die Sterilisation ist unproblematisch, und die Herstellungsverfahren sind variabel und müssen auf Denaturierungsprozesse keine Rücksicht nehmen.

Die künftige Arbeit könnte betreffen:

- die Wiederholung der Shuntversuche am kleineren Tier
- die parallele Untersuchung von Protein- und Thrombozytenadhäsion an Biomaterialien
- den Einfluß von Biodegradation und mechanischer Dauerbelastung auf Polymere, unter dem Aspekt der Thrombozytenadhäsion.

5. Zusammenfassung

Sechs Kunststoffmaterialien, Si, Si 3140, PVC, PUE, Pelle und PuSi, wurden auf ihre Thrombogenität getestet, in vitro und ex vivo. Zur Auswertung der Thrombozytenadhäsion wurden die Thrombozyten mit ^{51}Cr radioaktiv markiert und die Testschläuche nach Blutkontakt im γ -Counter untersucht. Die zum Leerwert erhöhte Impulszahl ergab die Berechnungsgröße für die anhaftenden Blutplättchen. Für die in-vitro-Versuche wurde Kälber- und Hundeblood mit radioaktiv markierten Thrombozyten in 30 cm lange Testschläuche gefüllt und in 37°C Umgebung 10 Minuten lang geschwenkt. Die Versuche wurden mit unbeschichteten und mit proteinbeschichteten (Albumin, Fibrinogen, γ -Globulin und Vollplasma) Schläuchen ausgeführt, insgesamt 94 Schläuche und 1128 Proben. Von den getesteten Materialien hatte PuSi die besten antithrombotischen Eigenschaften und war unabhängig von der Proteinbeschichtung. Die Reihenfolge der übrigen Materialien nach abnehmender Antithrombogenität: Pelle, PVC, Si 3140, PUE und Si. Bei diesen Materialien führte die Proteinbeschichtung generell zu einer Abnahme der anhaftenden Thrombozyten.

Die ex-vivo-Versuche wurden mit ^{51}Cr markierten Thrombozyten bei verschiedenen Expositionszeiten an einem Kalb mit extrakorporalem AV-Shunt ausgeführt. Aufgrund der hohen Verdünnung der markierten Thrombozyten konnten keine verwertbaren Ergebnisse erzielt werden. Die Funktionsfähigkeit der unmarkierten und markierten Thrombozyten wurde mittels induzierter Aggregation und durch die Thrombozytenüberlebenszeitmessung nachgewiesen.

Summary

Six biomaterials, Si Si 3140, PVC, PUE, Pelle and PuSi, were tested for their thrombogenicity, in vitro and ex vivo. Evaluating the platelet adhesion, the platelets were labelled with ^{51}Cr and after blood contact for different times, the test-tubes were evaluated in a gamma-counter. The counts per minute were used to quantify the platelet adhesion. The in vitro tests were carried out with blood of calves and dogs, filled in testtubes and moved in 37°C environment für 10 minutes. For the tests uncoated and coated (albumin, fibrinogen, γ -globulin, plasma) tubes were used, a total of 94 tubes and 1128 samples. The material with the lowest platelet adhesion number, independent from protein coating, was PuSi, followed by Pelle, PVC, PUE, Si and Si 3140. For Pelle, PUE and Si 3140 there was generally a reduce of adhered platelets after protein coating. The ex vivo tests were carried out with an extracorporeal AV-Shunt of a calf, after labelling of platelets with ^{51}Cr . Because of dilution of the labelled platelets in the calf's body there were no results of adhering labelled platelets. The platelet function control was proved by induced aggregation and with platelet survival-time measurements.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Abrahamson, A.F.:
A modification of the technique for ^{51}Cr -labelling of
blood platelets giving increased circulation platelet
radioactivity
Scand. J. Haemat. 5, 53-63, 1965.
- 2 Adam, W., H. Heimpel, E. Kratt:
Die Bestimmung der Thrombozytenüberlebenszeit mit ^{51}Cr
Blut, Band XIX, 337-346, 1969
- 3 Affeld, K., J. Berger, R. Müller, E.S. Bücherl:
A new method for an in-vitro-test of blood contact
materials
Proc. ESAO 1, 26-29, 1974
- 4 Baquey, C., Besse-Cathalinat, B. Masson, G. Janvier et al.:
Direct in vivo method to evaluate hemocompatibility of
artificial surfaces
Proc. ESAO 5, 34-37, 1978
- 5 Baurschmidt, P., M. Schaldach:
Alloplastic materials for heart valve prostheses
Med. & Biolog. Eng. & Comput. 18, 496-502, 1980
- 6 Bernstein, E.F., U. Marzec, G. Johnston:
Structural correlates of platelet functional damage by
physical forces
ASAIO Vol. XXIII, 617-625, 1977
- 7 Brash, J.L., S. Uniyal, Q. Samak:
Exchange of albumin adsorbed on polymer surfaces
ASAIO Vol. VV, 69-76, 1974
- 8 Breddin, K.:
Zur Klinik der Thrombozytenfunktionsstörung unter beson-
derer Berücksichtigung der Ausbreitungsfähigkeit der
Thrombozyten an siliconisierten Glasflächen
Thrombosis et Diathesis hemorrhagica 7, 525, 1963

- 9 Breddin, K.:
Funktionstest von Thrombozyten durch induzierte
Aggregation
unveröffentlicht
- 10 Breddin, K., H. Grun, H.J. Krzywanek, W.P. Schremmer:
Zur Messung der "spontanen" Thrombozytenaggregation,
Plättchenaggregationstest III Methodik
Klin. Wochenschrift 53, 81-89, 1975
- 11 Bruck, Stephen D.:
Blood Compatible Synthetic Polymers
Verlag Charles C. Thomas, 91-93, 1974
- 12 Coleman, D.L., A.J. Atwood, J.D. Andrade:
Platelet retention by albuminated glass and polystyrene
beads
J. of bioengineering Vol. 1, 33-44, 1976
- 13 Cortney, J.M., T. Gilchrist:
Silicone rubber and natural rubber as biomaterials
Med. & Biol. Eng. & Comput. 18, 538-540, 1980
- 14 Didisheim, P., J. Stropp, J. Borwick, E. Grabowski:
Species differences in platelet adhesion of biomaterials:
investigation by a new two stage technique
ASAIO Journal, July/August 1979
- 15 Emrich, D.:
Nuklearmedizin. Funktionsdiagnostik: Bestimmung der
Thrombozytenüberlebenszeit
Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1971
- 16 Eun Soo Lee, Sung Wan Kim:
Interaction of plasma proteins with bovine platelets
ASAIO Journal, April/June, 1980
- 17 Evans, G., J.F. Mustard:
Platelet surface reaction and thrombosis
Surgery Vol. 64, No. 1, 273-280, 1968

- 18 Falkenhagen, D., G. Esther, P. Ahrenholz, M. Holtz,
E. Schmitt, H. Klinkmann:
Blood compatibility and efficiency of different hemo-
adsorbents
Proc. ESAO 7, 137, 1980
- 19 Feuerstein, I.A., J.M. Brophy, J.L. Brash:
Platelet transport and adhesion to reconstituted collagen
and artificial surfaces
ASAIO Vol. XXI, 427, 1975
- 20 Fischer, J., R. Wolf:
Nuklearmedizin. Diagnostik in der Hämatologie
Dtsch. Therapiewoche in Karlsruhe, 1967
- 21 Fischer, J., U. Becker:
Herstellung und Charakterisierung von blutverträglichen
Kunststoff-Oberflächen
Vortrag auf dem Makromolekularen Kolloquium in Freiburg
am 1.3.1979
- 22 Fischer, J., U. Becker, K. Burg, N. Heimburger:
Correlations between chemical structure, physical proper-
ties and the in vitro and ex vivo blood compatibility of
biomaterials
Proc. ESAO 6, 207, 1979
- 23 Friedman, L.J., H. Liem, E.F. Grabowski, E.F. Leonard,
C. McCord:
Inconsequentiality of surface properties for initial
platelet adhesion
ASAIO Vol. XVI, 63-76, 1970
- 24 Gay, W.J.:
Methods of animal experimentation
Vol. V, Academic Pressing, 1974
- 25 Gott, V., A. Furuse:
Antithrombogenic surfaces, classification and in vivo
evaluation
Fed. Proc. Vol. 30, No. 5, 1679ff, 1971

- 26 Grabowski, E.F., K.K. Herther, P. Didisheim:
Human vs. dog platelet adhesion to Cuprophane under controlled conditions of whole blood flow
J. Lab. Clin. Med. 88, 368-374, 1976
- 27 Grabowski, E.F., P. Didisheim, C. Lewis, T. Franta, J.Q. Stropp:
Platelet adhesion to foreign surfaces under controlled conditions of whole blood flow: human vs rabbit, dog, calf, sheep, pig, macaque and baboon
ASAIO Vol. XXIII, 141-151-1977
- 28 Große-Siestrup, C., V. Unger, W. Lemm, D. Olsen, W. Krautzberger, K. Affeld, E.S. Bücherl:
Externer, arteriovenöser Langzeit-Shunt mit Testkammer für ex-vivo-Blutverträglichkeitsuntersuchungen an Polymeroberflächen
Biomed. Technik Band 23, Ergänzungsband, 1978
- 29 Große-Siestrup, C.:
Entwicklung und klinische Erprobung von Hautdurchleitungen
Inaugural Dissertation, Berlin, 1978
- 30 Große-Siestrup, C., D. Olsen, W. Lemm, V. Unger, K. Affeld, W. Krautzberger, E.S. Bücherl:
A long-term ex vivo shunt for blood compatibility tests of biomaterials
10th annual intern. biomaterials symposium
San Antonio, 1978
- 31 Große-Siestrup, C., W. Krautzberger, E.S. Bücherl:
Arterio-venous shunt with percutaneous leads in calves for long-term in vivo testing of blood-contact materials
J. of Biomedical Material Research Vol. 13, 15-22, 1979
- 32 Hall, D.E.:
Blood coagulation and its disorders in the dog
Baillière Tindall, London, 1972

- 33 Harker, L.A., S. Hanson, A. Hoffman:
Platelet kinetic evaluation of prosthetic materials in vivo
Annals of the New Academy of Sciences Vol. 283, 317-331, 1977
- 34 Heimbürger, N.:
Entwicklung und Verbesserung relevanter Methoden für die Beurteilung von Kunststoffen auf Blutverträglichkeit
gsf Projekt, Kurzbericht über den Zeitraum 1.7.79-31.10.79
- 35 Kaiser, M., E.S. Bücherl:
In vitro tests of thrombogenicity, protein adsorption and hemolytic properties of biomaterials
Proc. ESAO 6, 203-206, 1979
- 36 Kim, S.W., R.G. Lee, H. Oster, D. Coleman, J.D. Andrade, D.J. Lenz, D. Olsen:
Platelet adhesion to polymer surfaces
ASAI0 Vol. XX, 449-455, 1974
- 37 Kusserow, B.K., R. Larrow, J. Nichols:
Observations concerning prosthesis-induced thrombembolic phenomena made with an in vivo embolus test system
ASAI0 Vol. XVI, 58-61, 1970
- 38 Laki, K.:
Hemostasis in the Animal Kingdom
Research Animals in Medicine, Chapter V
"Hematology", 473-481, 1973
- 39 Lemm, W., C. Große-Siestrup, D. Olsen, E.S. Bücherl:
Blood compatibility tests of biomaterials on the basis of the protein-adsorption-hypothesis. Extensions and comparison with other methods
Proc. ESAO 4, 168-174, 1977
- 40 Lemm, W., V. Unger, M. Kaiser, C. Große-Siestrup, E.S. Bücherl:
A comparing evaluation of three blood compatibility tests for biomaterials
Proc. ESAO 5, 29-33, 1978

- 41 Lemm, W., V. Unger:
Proteinadsorption an verschiedenen Kunststoffen in vitro
Biomed. Technik, Band 23, Ergänzungsband, 171-172, 1978
- 42 Lemm, W., L. Pirling, E.S. Bücherl:
Biodegradation of some biomaterials in vitro
Proc. ESAO 7, 86-89, 1980
- 43 Lemm, W. V. Unger, E.S. Bücherl:
Blood compatibility of polymers in vitro and in vivo tests
Med. & Biolog. Eng. & Comput. 18, 521-526, 1980
- 44 Leval de, M., J.D. Hill, H. Mielke, M.L. Branson,
C. Smith, F. Gerbode:
Platelets kinetics during extracorporeal circulation
ASAIO Vol. XVIII, 1972
- 45 Lewis, J.M.O., N. Macleod, W.D. Taylor:
A critical investigation of the fluid mechanical factors
associated with clotting in Petschek's stagnation point
flow chamber experiments
Proc. ESAO 5, 124-127, 1978
- 46 Lindsay, R.M., J. Rourke, B. Reid, M. Friesen, A. Linton,
J. Courtney, T. Gilchrist:
Platelets, foreign surfaces and heparin
ASAIO Vol. XXII, 292-295, 1976
- 47 Lyman, D.J., J. Brash, S. Chaikin, M. Klein, M. Carini:
The effect of chemical structure and surface properties
of synthetic polymers on the coagulation of blood
II. protein and platelet interaction with polymer surfaces
ASAIO Vol. XIV, 250-255, 1968
- 48 Lyman, D.J., K.G. Klein, J. Brash, B.K. Fritzinger:
The interactions of platelets with polymer surfaces
Sonderdruck thromb. et diathesis hemorrhagica
Vol. XXIII, No. 1, 1970

- 49 Lyman, D.J., L.C. Metcalf, D. Albo, K. Richards, J. Lamb:
The effect of chemical structure and surface properties
of synthetic polymers on the coagulation of blood
III. in vivo adsorption of proteins on polymer surfaces
ASAI0 Vol. XX, 474-478, 1974
- 50 Maeker, H.U.:
Chirurgisch verwendungsfähige Kunststoffe und ihre
Blutverträglichkeit
Inaugural Dissertation, Berlin, 1976
- 51 Marzec, U., G. Johnston, E.F. Bernstein:
Platelet function in calves
ASAI0 Vol. XXI, 581-586, 1975
- 52 Marzec, U., P. Shoor, E.F. Bernstein:
Fallibility of the platelet count and fibrinogen concen-
tration in evaluating circulatory assistance techniques
ASAI0 Vo. XIV, 1978
- 53 Mason, M.D. et al.:
Working Group on Blood-Material Interactions:
Final Report, Mai 1979
- 54 Miyata, T., A. Schwartz, C.L. Wang, A.L. Rubin,
K.H. Stenzel:
Deposition of platelets and fibrin on chemically
modified collagen hollow fibers
ASAI0 Vol. XXII, 261-268, 1976
- 55 Mollison, P.L.:
Kapitel 2 in "Blood Transfusion in Clinical Medicine":
Platelet Transfusion
Blackwell Scientific Publications, 1975
- 56 Neumann, A.W., W. Zingg, O.S. Hum:
Adhesion of platelets to smooth solid surfaces
Biomed. Technik, Band 20, Ergänzungsband, 57-58, Mai 1975

- 57 Neumann, A.W., S.K. Chang, M.A. Moscarello, W. Zingg,
O.S. Hum, B. Rueggsegger:
Interaction of pig platelets in low protein suspensions
with glass, polymer, and protein surfaces
Biomed. Technik, Band 21, Ergänzungsband, 77-78, Juni 1976
- 58 Nosé, Y., H. Kambic:
Developement of blood and tissue compatible materials
1st Annual report, Cleveland Clinic Foundation, 1973
- 59 Nuwayser, E.S., P.B. Mansfield, A. Wechezak, R. Kahn,
W.E. Burkel, J.B. Boatman:
Cultured linings vor vascular assist devices
ASAIO Vol. XIX, 168-174, 1973
- 60 Olsson, P., J.C. Eriksson, H. Lagergreen, R. Larrson:
Requirements of blood compatible surfaces with special
reference to heparinized surface
Proc. ESAO 5, 38-41, 1978
- 61 Predecki, P.K., L. Life, P.A. Russel, M.M. Newman:
Platelet adhesion to porous surfaces
J. Biomed. Mater. Research 11, 767, 1977
- 62 Richardson, P.D., S.F. Mohammed, R.G. Mason:
Flow chamber studies of platelet adhesion at controlled,
spatially varied shear rates
Proc. ESAO 4, 175-185, 1977
- 63 Roohk, H.V., J. Pick, R. Hill, E. Hung, R.H. Bartlett:
Kinetics of fibrinogen and platelet adherence to biomaterials
ASAIO Vol. XXII, 1-7, 1976
- 64 Roohk, H.V., M. Nakamura, R.L. Hill, E.Hung, R.H. Bartlett:
A thrombogenic index for blood contact materials
ASAIO Vol. XXIII, 152-161, 1977
- 65 Rose, J.C., H.P. Broida:
Effects of plastic and steel surfaces on clotting time of
human blood
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 86, 384, 1954

- 66 Schiessler, U., H.-J. Jaster, C. Große-Siestrup, V. Unger, E.S. Bücherl:
Normalwerte beim Kalb
Zbl. Vet. Med. A, 24, 298-310, 1977
- 67 Schladitz, G., H. Brauner, G. Harbauer, M. Schaldach:
Zum Einfluß der Implantationstechnik auf die Thrombo-
resistenz von Biomaterialien
Biomed. Technik Band 23, Ergänzungsband, 170-171, 1978
- 68 Schultz, J.S., A. Ciarkowski, J.D. Goddard,
S.M. Lindenauer, J.A. Penner:
Kinetics of thrombus formation
ASAIO Vol. XXI, 269-277, 1976
- 69 Sharma, N.C., F. Mohammad, Y.K. Chuang, R.G. Mason:
Inhibition of platelet adhesion to glass by certain human
plasma and serum proteins
ASAIO Journal April/June 1980
- 70 Sung Wan Kim, Eun Soo Lee:
The role of adsorbed proteins in platelet adhesion onto
polymers surfaces
Symposium on Medical Polymers, Prague Aug. 1977
- 71 Thakur, M.L., M. Welch, H. Joist, E. Coleman:
Indium-111 labelled platelets: studies on preparation and
evaluation of in vitro and in vivo functions
Thrombosis Research Vol. 9, 345-357, 1976
- 72 Thiele R., C. Große-Siestrup, V. Unger, W. Lemm, P. Bensch,
E.S. Bücherl:
Platelet adhesion from platelet rich blood to polyurethane
and silicone surfaces before and after protein coating
Proc. ESAO 7, 80, 1980
- 73 Turitto, V., E.F. Leonard:
Platelet adhesion to spinning surface
ASAIO Vol. XVIII, 348-358, 1972

- 74 Unger, V., K. Gerlach, C. Große-Siestrup, W. Lemm,
E.S. Bücherl:
Lebensdauer-Untersuchungen an Blutbestandteilen von Ver-
suchstieren mit künstlichen Blutpumpen und AV-Shunts
Abstract BMFT, 1980
- 75 Volder, J.G., C.Kwan-Gott, M. Nielson, J. Kolff,
E.J. Hersgold:
In vivo testing of thrombogenesis of materials
ASAIO Vol. XIX, 210, 1973
- 76 Wang, C.L., T. Miyata, S. Schlear, B. Weksler, A.L. Rubin,
K.H. Stenzel:
Collagen and glomerular basement membrane effects on
platelets
ASAIO Vol. XXI, 422-425, 1975
- 77 Whalen, R.L., D.L. Jeffery, J.C. Norman:
A new method of in vivo screening of thromboresistant
biomaterials utilizing flow measurement
ASAIO Vol. XIX, 19-24, 1973
- 78 Wucherpfennig, G.:
In vitro Testung chirurgisch verwendbarer Kunststoffe
im geschlossenen Zellkammersystem
Inaugural Dissertation, Berlin, 1977

Besonders herzlich möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. med. E.S. Bücherl, Direktor der Chirurgischen Klinik des Klinikum Westend, für die Überlassung des Themas und für sein freundliches Interesse am Fortgang der Untersuchungen bedanken.

Herrn Dr. med. vet. Ch. Große-Siestrup danke ich für seine Hilfe und seine Anregungen bei der Durchführung und Auswertung der Versuchsreihen.

Herrn Dipl.-Ing. V. Unger und Frau P. Bensch, der medizinisch-technischen Assistentin, sowie Herrn Dr. W. Lemm gilt mein besonderer Dank für die wissenschaftliche Beratung auf physikalischem und chemischem Bereich.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Herrn B. Franke und bei Herrn W. Mudra für Fotografien und Zeichnungen bedanken und bei Frau E.M. Marx für ihre liebevolle Betreuung.

Lebenslauf

Am 29.03.1954 wurde ich, Richard Thiele, in Pare/Indonesien geboren. Meine Eltern sind der Arzt Dr. med. Karl-Richard Thiele und seine Ehefrau Anita, geb. Epoff.

Meine 1960 begonnene Schulausbildung schloß ich 1972 am Graf-Zeppelin-Gymnasium in Friedrichshafen mit der allgemeinen Hochschulreife ab.

Die Wehrpflicht leistete ich 1973 im Sanitätsdienst, wobei ich drei Monate in einem zivilen Krankenhaus als Krankenpflegehelfer arbeitete, was mir mit Abschlußprüfung und schon vorausgegangener Krankenhausarbeit zum 1-jährigen Krankenpfleger gereichte.

Im Wintersemester 1974 begann ich das Tiermedizinstudium an der Freien Universität Berlin, wovon ich 1976 zum Humanmedizinischen Fachbereich wechselte. Am 4. März 1982 bestand ich hier den 3. Teil des medizinischen Staatsexamens.

